UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

Unité D'Enseignement et de Recherches des Mécanismes
D'action des Médicaments et des Toxiques

ANNEE 1971 - 1972

Série E. N° 248

THESE

présentée

A l'Unité d'Enseignement et de Recherches
des Mécanismes d'Action des Médicaments et des Toxiques de
l'Université René Descartes de Paris

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Colette THOMAS - MORVAN
Attachée de Recherches à l'INSERM

Titre de la thèse :

ETUDE DE LA SYNTHESE HORMONALE ET DES IODOPROTEINES THYROIDIENNES DANS DES TISSUS THYROIDIENS HUMAINS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES.

Soutenue le : 28 Février 1972

JURY :	Mr. R. TRUHAUT	Président
	Mr. R. MICHEL	Examinateurs
	Mr. M. TUBIANA	Examinateurs

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

Unité D'Enseignement et de Recherche des Mécanismes

d'Action des Médicaments et des Toxiques

ANNEE [illegible] - [illegible] Série E. N° [illegible]

T H E S E

présentée

à l'Unité d'Enseignement et de Recherche

des Mécanismes d'Action des Médicaments et des Toxiques de

l'Université René Descartes de Paris

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Doctorat d'Etat)

par

[illegible] THABET NOWAR

Attachée de Recherches à l'INSERM

Titre de la thèse :

ETUDE DE LA SYNTHESE HORMONALE ET DES IODOPROTEINES THYROIDIENNES DANS DES TISSUS THYROIDIENS HUMAINS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES

Soutenue le : 28 Février 1977

JURY : Mr. R. TRUHAUT — Président

Mr. R. MICHEL, Mr. M. TUBIANA — Examinateurs

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

Unité D'Enseignement et de Recherches des Mécanismes
D'action des Médicaments et des Toxiques

ANNEE 1971 - 1972

Série E. N° 248

THESE

présentée

A l'Unité d'Enseignement et de Recherches
des Mécanismes d'Action des Médicaments et des Toxiques de
l'Université René Descartes de Paris

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Colette THOMAS - MORVAN
Attachée de Recherches à l'INSERM

Titre de la thèse :

ETUDE DE LA SYNTHESE HORMONALE ET DES IODOPROTEINES THYROIDIENNES DANS DES TISSUS THYROIDIENS HUMAINS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES.

Soutenue le : 28 Février 1972

JURY :	Mr. R. TRUHAUT	Président
	Mr. R. MICHEL	Examinateurs
	Mr. M. TUBIANA	Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents,

A mon mari,

A tous ceux qui me sont chers.

Les recherches qui font l'objet de ce travail ont été réalisées dans le Laboratoire de Physiopathologie Thyroïdienne de l'Institut de Recherches de Radiobiologie Clinique à Villejuif, sous la direction de Monsieur le Professeur M. TUBIANA.

C'est à lui que s'adressent avant tout mes remerciements. Depuis le jour où il m'a accueillie avec bienveillance dans son équipe, il m'a guidée et conseillée au cours de mes recherches avec beaucoup de gentillesse, et c'est grâce à sa grande compétence dans le domaine thyroïdien que ce travail a pu être mené à bien. Je suis heureuse de pouvoir lui exprimer ici mon respectueux attachement et ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur R. TRUHAUT, Professeur de Toxicologie et d'Hygiène Industrielle à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Je remercie également Monsieur le Professeur R. MICHEL, Professeur d'Endocrinologie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris, pour l'intérêt qu'il a bien voulu manifester à mon égard. Ses conseils judicieux m'ont été très précieux dans l'élaboration de ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement Mademoiselle le Docteur B. NATAF, Maître de Recherches au CNRS, qui a guidé mes recherches au cours de ce travail et m'a fait bénéficier de toute son expérience. Ces travaux ont été effectués avec sa collaboration, et je la prie de trouver ici, avec ma respectueuse amitié, un témoignage de ma reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548020_0021

Je remercie très sincèrement Monsieur le Docteur R. GERARD-MARCHANT, Chef du Laboratoire d'Anatomie-Pathologie de l'Institut GUSTAVE-ROUSSY, qui a effectué le choix des fragments thyroïdiens et leur diagnostic histologique. Sa compétence et son aimable collaboration ont été très précieuses dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Docteur R. CERIANI, Ph. D. Par sa collaboration fructueuse et ses précieux conseils, il a beaucoup contribué à faire progresser cette étude des protéines thyroïdiennes. Je tiens à lui exprimer ici ma vive gratitude.

Je remercie enfin Madame M. GERBOD, ainsi que toutes les personnes du Laboratoire des Isotopes et de l'Institut GUSTAVE-ROUSSY qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail.

S O M M A I R E

Pages

INTRODUCTION. - 1

MATERIEL ET METHODES. - 8

- Tissus thyroïdiens humains 8
- Marquage des tissus in vivo 8
- Thyroïdes de chiens traités au PTU 8
- Culture organotypique 9
- Dosage de l'iode stable (^{127}I) 10
- Répartition de l'iode radioactif dans les différents composés iodés séparés par chromatographie 11
- Mesure de la radioactivité ^{131}I et ^{125}I 12
- Mesure de la radioactivité ^{14}C 12
- Relargage par le sulfate d'ammonium 12
- Ultracentrifugation en gradient de saccharose 13
- Mesure de la teneur en thyroglobuline (Tg) et en fractions légères 3-8 S des tissus thyroïdiens 14
- Mesure du taux d'iodation de la thyroglobuline et des fractions légères 14
- Electrophorèse en gel de polyacrylamide 15
- Détermination des poids moléculaires 16
- Focalisation isoélectrique 16

RESULTATS. -

A - Hormonogénèse thyroïdienne 18

I - Etudes in vivo

- 1) Etude de l'hormonogénèse thyroïdienne après marquage à ^{131}I (24ème heure) 18
- 2) Relation entre la synthèse hormonale et la teneur en iode (^{127}I) des tissus thyroïdiens 23

Pages

. 3) Cinétique de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes 23

II - Etudes en culture organotypique 25

. 1) Résultats histologiques 28

. 2) Métabolisme de ^{125}I ajouté en culture 28

B - Caractères des iodoprotéines thyroïdiennes 31

I - Etudes in vivo

. 1) Relargage par le sulfate d'ammonium 31

a - Tissus thyroïdiens humains 32

b - Chiens traités au PTU 34

. 2) Ultracentrifugation en gradient de saccharose 34

a - Répartition des iodoprotéines marquées à ^{131}I in vivo 36

b - Teneur en Tg et en fractions légères 3-8 S, et taux d'iodation de ces protéines 38

II - Etudes en culture organotypique 41

. 1) Incorporation de l'iode radioactif (^{125}I) en culture dans les iodoprotéines solubles 42

. 2) Action de la TSH 44

. 3) Biosynthèse des iodoprotéines thyroïdiennes solubles 48

a - Tissu normal 48

b - Tissus pathologiques 51

Pages

III - Etudes des fractions légères 3-8 S 54

. 1) Electrophorèse en gel de polyacrylamide 56

. 2) Focalisation isoélectrique 60

. 3) Cas particulier d'un goître exceptionnel ou la Tg est absente 62

DISCUSSION. - 65

. 1) Synthèse hormonale 65

. 2) Caractères de la thyroglobuline 68

. 3) Iodoprotéines différentes de la thyroglobuline 71

. 4) Biosynthèse de la thyroglobuline 73

. 5) Nature des fractions légères 3-8 S 75

CONCLUSION. - 79

BIBLIOGRAPHIE. - 83

INTRODUCTION

La thyroglobuline (Tg) est la protéine la plus abondante du tissu thyroïdien. Cette protéine a été étudiée depuis longtemps, mais les connaissances actuelles sur sa structure sont encore très incomplètes.

La thyroglobuline est une glycoprotéine de poids moléculaire élevé (670.000 environ), ayant un coefficient de sédimentation de l'ordre de 19 unités Svedberg (19 S), et contenant 8 à 10 % de glucides et la plus grande partie de l'iode organique de la glande. Son caractère globulinique a été mis en évidence au moyen de la précipitation par le sulfate d'ammonium à 50 % de saturation (Heidelberger et coll. 1933, Derrien et coll. 1948).

Shulman et coll. (1955, 1957) ont montré que la Tg 19 S était accompagnée d'autres constituants de coefficients de sédimentation 27 S, 12 S et 3-8 S. L'espèce 27 S, de poids moléculaire double de celui de la 19 S, représente un dimère de la 19 S. L'espèce 12 S, de poids moléculaire égal à la moitié de celui de la 19 S, est considérée comme une sous-unité de la Tg ; elle n'apparaîtrait que lors de la dissociation des molécules de 19 S dans certaines conditions expérimentales (congélation ou alcalinisation des extraits) ; il semble cependant que ce constituant existe à l'état normal chez certaines espèces animales (cobaye et quelques vertébrés inférieurs) (Salvatore et coll. 1965, Lachiver et coll. 1965, Aloj et coll. 1967). Les constituants 3-8 S ont fait l'objet de divers travaux, mais leur nature et leurs caractères sont encore mal connus. Dès 1957 cependant, Shulman et coll. ont isolé, entre 2,5 et 3,0 M de sulfate d'ammonium une protéine 4 S ayant des caractères électrophorétiques et immunologiques analogues à ceux de la sérumalbumine, et ces auteurs ont proposé de l'appeler thyralbumine.

Le mécanisme de la biosynthèse de la thyroglobuline est encore mal connu. Il a été montré cependant que la biosynthèse de cette protéine et son iodation s'opèrent en 2 étapes distinctes : l'armature polypeptidique est d'abord synthétisée, l'iodation de certains résidus de tyrosine intervient ensuite (SEED et GOLDBERG 1965, LISSITZKY et coll. 1965).

Des perturbations dans le métabolisme de l'iode sont observées dans de nombreuses maladies thyroïdiennes. En effet, divers travaux ont montré que, dans des glandes pathologiques (adénomes, goîtres, cancers thyroïdiens), la teneur en iode du tissu thyroïdien est faible et la synthèse hormonale perturbée : le pourcentage de 3 - iodo - L - tyrosine (MIT) est supérieur à celui de 3,5 - diiodo - L - tyrosine (DIT), et la proportion de L - thyroxine (T_4) et de 3,5,3' - triiodo - L - thyronine (T_3) est faible (TRIANTAPHYLLIDIS et TUBIANA 1956, PITT-RIVERS et coll. 1957, ERMANS et coll. 1961, BECKERS et DE VISSCHER 1963).

Nous nous sommes intéressés tout d'abord à l'hormonosynthèse thyroïdienne, dans les glandes normales et dans des cas pathologiques divers. Nous nous sommes demandés s'il existe une relation entre la teneur en iode (^{127}I) d'un tissu thyroïdien et sa teneur en hormones thyroïdiennes marquées, 24 heures après l'administration d'iode radioactif (^{131}I). De plus, nous avons cherché à suivre l'évolution dans le temps de la teneur en hormones marquées, afin de voir si, dans les tissus pathologiques, cette teneur augmente avec le temps. Ceci nous a conduit à effectuer des doubles marquages à ^{131}I et ^{125}I, les deux administrations d'iode radioactif étant séparées par des intervalles de temps de plusieurs jours.

Les hormones thyroïdiennes se formant au sein même des molécules de thyroglobuline, on pouvait penser que les troubles de la synthèse hormonale dans les glandes pathologiques pourraient être liés à des anomalies dans les iodoprotéines thyroïdiennes.

On a signalé en effet, dans certaines glandes pathologiques, une augmentation de la proportion des iodoprotéines plus solubles

que la Tg dans le sulfate d'ammonium : Stanley (1956), Easty et coll. (1958) dans quelques cas de cancers thyroïdiens ; Robbins et coll. (1959), de Groot et coll. (1959 et 1960), dans des adénomes et des goitres congénitaux. En 1959, Roche, Michel et Tubiana avaient étudié 3 cas de goitres avec hypothyroïdie et hyperfixation de l'iode radioactif, chez lesquels la synthèse hormonale était très perturbée puisque les iodothyronines étaient pratiquement absentes. Parmi ces 3 cas, deux présentaient une augmentation de la proportion d'iodoprotéines solubles dans les fortes concentrations salines. Ce fait a été retrouvé dans 3 autres cas de goitres (Michel et coll. 1964).

Nous avons poursuivi cette étude dans différentes glandes pathologiques, afin de rechercher quelle était la fréquence de l'augmentation de la proportion d'iodoprotéines plus solubles que la Tg dans le sulfate d'ammonium. De plus, nous avons établi les profils de sédimentation des iodoprotéines extraites de divers tissus thyroïdiens, normaux et pathologiques, afin d'étudier la répartition de l'iode radioactif dans les différentes fractions. Dans les cas où le tissu thyroïdien fixe très peu l'iode radioactif, notamment les cancers thyroïdiens, cette étude a été effectuée in vitro, en culture organotypique, en ajoutant au milieu des quantités assez élevées d'iode radioactif (^{125}I).

Nous nous sommes intéressés également à l'effet de la TSH ajoutée en culture sur l'incorporation de l'iode radioactif dans les iodoprotéines thyroïdiennes. Il a été montré en effet que la TSH peut dans certains cas stimuler le métabolisme de l'iode in vitro, en augmentant la fixation de l'iode radioactif dans le tissu thyroïdien (Nataf et coll. 1965, 1969). Nous avons recherché si on pouvait observer un effet semblable sur les iodoprotéines thyroïdiennes, en particulier dans les tissus où le métabolisme de l'iode est très déficient (cancers thyroïdiens).

Certains auteurs ont montré que, dans les glandes pathologiques, la Tg se trouve généralement en quantité inférieure à la normale (Stanley 1956, Robbins et coll. 1959, Roche et coll. 1959,

Beckers et Visscher 1961). Lissitzky et coll. (1967 et 1968) ont même décrit deux cas de goitres congénitaux où la Tg était pratiquement absente ; dans ces cas, les auteurs n'ont observé qu'une seule fraction iodoprotéique, sédimentant plus lentement que la Tg. On pouvait donc penser que, dans les glandes pathologiques, le trouble principal serait un défaut de synthèse de la thyroglobuline.

Ceci nous a amené à étudier la synthèse de la Tg, en comparant dans le tissu normal et le tissu pathologique l'incorporation in vitro d'acides aminés marqués au ^{14}C.

Seed et Goldberg (1963) ont, les premiers, analysé la cinétique de synthèse de la Tg, au cours d'incubations de courte durée de coupes de thyroïdes de mouton en présence d'acides aminés marqués au ^{14}C. Ces auteurs ont montré que les fractions 19 S, 12 S et 3-8 S sont synthétisées in vitro, et que les acides aminés s'incorporent d'abord dans les fractions 3-8 S et 12 S avant de marquer la Tg. Ces résultats, ainsi que ceux d'autres auteurs (Lissitzky et coll. 1964, 1965 et 1969 ; Nunez et coll. 1965 ; Vecchio et coll. 1966 et 1969 ; Mates et Shulman 1969), permettent d'envisager que les fractions 3-8 S et 12 S pourraient être des précurseurs dans la synthèse de la Tg.

D'autres travaux suggèrent au contraire que la fraction légère 3-8 S pourrait être un produit de protéolyse de la Tg (de Groot et coll. 1960, Simon et coll. 1966, Torresani et coll. 1968) ou un constituant métaboliquement indépendant de cette protéine.

Nous avons donc entrepris l'étude de la biosynthèse de la thyroglobuline chez l'Homme, au moyen de la culture organotypique ; en effet, cette méthode a l'avantage de pouvoir être poursuivie pendant plusieurs jours, alors qu'en simple incubation dans le milieu de Krebs-Ringer le tissu thyroïdien ne peut survivre que pendant un temps relativement court (quelques heures). Nous avons pu ainsi étudier la répartition des acides aminés marqués au ^{14}C après des temps de marquage assez longs (24 heures de marquage), ou au contraire effectuer des marquages courts (2 heures), suivis d'une chasse en milieu non radioactif pendant un temps assez long (2 ou 3 jours).

La fraction protéique plus légère que la Tg (fraction 3-8 S) n'étant pas encore parfaitement connue, nous avons étudié tout particulièrement cette fraction, afin de tenter d'en déterminer la nature et le rôle physiologique éventuel. Des travaux récents (Roques et coll. 1969) ont montré que cette fraction est en fait hétérogène et qu'elle comporte plusieurs protéines de natures différentes. Parmi ces protéines, la présence d'une albumine iodée est généralement admise (Shulman 1957, Jonckheer 1963, Lissitzky et coll. 1967 et 1968). Mais l'origine de cette albumine est encore très controversée : certains pensent en effet qu'elle serait d'origine thyroïdienne (Otten et coll. 1971), tandis que pour d'autres elle serait d'origine sérique (Van Middlesworth et Triantaphyllidis 1967, Lissitzky et coll. 1967).

Enfin, il nous a paru intéressant d'étudier les caractères de la Tg elle-même. En effet, on pourrait s'attendre à observer, dans les glandes pathologiques, des altérations de la structure de la Tg, entraînant des modifications dans ses caractères de solubilité, ou dans sa constante de sédimentation, ou dans sa teneur en iode. Il semble que la Tg des goitres et des cancers thyroïdiens soit toujours moins iodée que la Tg normale (Salabé et coll. 1965, de Combrugghe 1968, Valenta et coll. 1968).

En ce qui concerne le coefficient de sédimentation, les résultats sont assez contradictoires : certains auteurs n'ont noté aucune différence appréciable entre la Tg pathologique et la Tg normale (Salabé et coll. 1965, Peyrin et coll. 1967, Valenta et coll. 1968) ; de Combrugghe (1968) trouve pour la glande goitreuse une légère modification de la constante de sédimentation (18 S au lieu de 19 S) ; enfin, dans quelques rares cas, on a signalé la présence d'une Tg tout à fait anormale, de constante de sédimentation très inférieure à celle de la Tg normale, (Robbins, dans une tumeur thyroïdienne expérimentale de rat ; Van Jaarsveld et coll., dans un goitre congénital bovin ; Falconer, dans un goitre congénital de moutons mérinos ; Cassano et coll., dans des goitres congénitaux humains).

L'objet de ce travail a donc été tout d'abord une étude de l'hormonosynthèse thyroïdienne dans des tissus thyroïdiens humains, normaux et pathologiques, l'étude des tissus pathologiques étant conçue comme une méthode d'investigation permettant d'analyser les troubles biochimiques qui déterminent les défauts de l'hormonogénèse. C'est ainsi que nous avons recherché, dans les glandes pathologiques, les modifications éventuelles, quantitatives ou qualitatives, des iodoprotéines thyroïdiennes, et les anomalies du métabolisme iodé et de la production d'hormones qui pourraient en résulter.

Nous avons en outre étudié la biosynthèse de la Tg, dans les tissus thyroïdiens normaux et pathologiques.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux protéines légères (fraction 3-8 S), encore mal connues, et nous avons tenté de déterminer leur nature et leurs rapports éventuels avec la Tg.

Pour ces études, il paraissait nécessaire d'examiner des tissus thyroïdiens très variés, les plus intéressants étant ceux dont le métabolisme est le plus perturbé. En effet, comme cela arrive très souvent en endocrinologie, l'étude des anomalies du fonctionnement d'une glande et des troubles de l'hormonogénèse permettent de mieux comprendre le fonctionnement normal de la glande. Nous avons en particulier systématiquement étudié des tissus thyroïdiens pathologiques, en cherchant à y découvrir soit des troubles de la synthèse hormonale, soit des anomalies des iodoprotéines, afin de mettre en évidence les relations existant entre ces deux types de troubles.

Nous avons ainsi étudié des fragments thyroïdiens provenant de nombreux patients opérés pour divers troubles de la thyroïde (adénomes, goitres, thyroïdites de Hashimoto, cancers de la thyroïde, hyperthyroïdies traitées par antithyroïdiens). Nous avons d'autre part cherché à modifier expérimentalement le métabolisme thyroïdien chez l'animal, au moyen d'antithyroïdiens, et nous avons ainsi analysé la synthèse hormonale et les iodoprotéines thyroïdiennes de

chiens traités au propylthiouracile(PTU).

Les tissus thyroïdiens ont été marqués à ^{131}I in vivo. Dans certains cas, en particulier pour les tissus thyroïdiens fixant très peu l'iode radioactif, nous avons effectué un marquage in vitro. Pour cela, la méthode de culture organotypique nous a été très précieuse. Nous avons aussi utilisé cette technique pour l'étude de la biosynthèse des protéines thyroïdiennes, à l'aide de l'incorporation in vitro d'acides aminés marqués au ^{14}C, qu'il serait dangereux d'administrer in vivo aux patients.

Après l'exposé du matériel et des méthodes utilisées, nous donnerons les résultats de notre étude de l'hormonogénèse thyroïdienne, puis ceux de l'étude de l'iodation et de la biosynthèse des iodoprotéines thyroïdiennes.

MATERIEL ET METHODES

TISSUS THYROÏDIENS HUMAINS.

Les fragments thyroïdiens pathologiques ont été prélevés lors d'interventions chirurgicales chez des malades souffrant de divers troubles de la glande thyroïde (adénomes, goitres, hyperthyroïdies, thyroïdites de Hashimoto, cancers de la thyroïde). Les fragments dits "normaux" ont été prélevés également chez des malades, mais ce sont des fragments périnodulaires prélevés le plus loin possible de la région pathologique de la glande.

Les fragments thyroïdiens, prélevés stérilement à partir de la pièce opératoire, sont placés immédiatement dans un milieu stérile.

MARQUAGE DES TISSUS IN VIVO.

Les patients ont reçu une dose traceuse (250 µCi) d'iode radioactif (^{131}I), 20 à 24 heures avant l'intervention chirurgicale. Dans certains cas, les malades ont reçu un double marquage isotopique selon la méthode décrite par Höfer et coll.(1963): 250 µCi de ^{131}I a été administré la veille de l'intervention, et 250 µCi de ^{125}I à des temps variables avant l'opération (2 à 21 jours).

THYROIDES DE CHIENS TRAITES AU PTU.

Trois chiens ont reçu par voie orale 100 à 200 mg par jour de propylthiouracile (PTU) pendant 5 à 6 semaines. Trois chiens témoins ont reçu la même alimentation dépourvue de PTU. ^{131}I a été injecté 24 heures avant le prélèvement, et ^{125}I 4 ou 6 jours avant le prélèvement. L'exérèse d'un seul lobe thyroïdien a été effectué sous anesthésie au Nembutal.

CULTURE ORGANOTYPIQUE.

Nous avons utilisé la méthode décrite par Chen (1954), mise au point pour la culture de thyroïdes foetales de rat par Nataf et coll. (1965), puis adaptée à la culture de fragments thyroïdiens humains (Nataf et coll. 1966).

La méthode de culture organotypique permet de maintenir des fragments de tissus thyroïdiens pendant quelques jours, alors qu'en incubation dans le milieu de Krebs-Ringer le tissu thyroïdien ne peut survivre que pendant un temps relativement court (quelques heures). Cette méthode de culture en milieu nutritif liquide permet d'ajouter directement dans le milieu des marqueurs radioactifs, et éventuellement des substances, telles la TSH, capables d'agir sur le métabolisme des tissus thyroïdiens.

Milieu de base : Le milieu de base utilisé est un milieu synthétique complet : NCTC 109 (Eurobio), auquel on ajoute de la pénicilline (10^5 U/litre), et que l'on stérilise par filtration (Millipore). Ce milieu est enrichi de 5 % de sérum de poulain (Mérieux) stérile, que l'on ajoute extemporanément.

Milieu avec TSH : La TSH (Thytropar 10 U.I., Armour) est dissoute dans 2 ml de milieu de base. A partir de cette solution-mère, on prépare des milieux à 3 concentrations différentes de TSH : 50 mU/ml, 5 mU/ml et 0,5 mU/ml.

Les fragments thyroïdiens de deux ou trois mg environ, isolés stérilement à partir de la pièce opératoire, sont mis en culture le plus rapidement possible. Un fragment est prélevé avant la culture pour l'étude histologique. La culture est faite dans des boîtes de Pétri en plastique, renfermant 6 ml de milieu. Les fragments sont déposés sur une grille métallique inoxydable, montée sur quatre pieds, placée dans la boîte de Pétri de telle sorte que les fragments reposent à la surface du milieu. Trois à quatre fragments sont placés sur chaque grille. Les boîtes de Pétri sont introduites dans un caisson étanche (caisson de LWOFF avec hublots), saturé en humidité, à la température de 37°. L'atmosphère du caisson est constitué d'un mélange

de 92,5 % d'O2 et 7,5 % de CO2, stérilisé par filtration sur Millipore ; le pH du milieu est ainsi maintenu à 7,3. Aucun changement de milieu n'est effectué entre le début et la fin de la culture.

Les tissus thyroïdiens peuvent être maintenus en culture pendant plusieurs jours. Dans notre étude, nous n'avons pas cherché à cultiver le tissu thyroïdien le plus longtemps possible, mais à étudier le métabolisme thyroïdien dans des conditions expérimentales satisfaisantes. La durée de nos cultures a donc été de deux à cinq jours. Le marqueur radioactif n'est ajouté au milieu qu'après un laps de temps de 24 heures au moins, ce qui permet au tissu thyroïdien de s'adapter aux conditions de la culture (milieu, pH, température, oxygénation). A des temps variables avant la fin de la culture (2 h, 5 h ou 24 h), on introduit stérilement dans chaque boîte de Pétri les marqueurs radioactifs (Saclay) : soit 25 µCi de ^{125}I, soit 10 µCi d'un hydrolysat lyophilisé de protéines d'algues (chlorella vulgaris) marquées au ^{14}C (activité spécifique 0,5 mCi/mg), que l'on dissout dans le milieu de base avant l'emploi. Une dilution du marqueur radioactif ajouté au milieu de culture est compté et permet le calcul de la fixation par le tissu thyroïdien.

A la fin de la culture, quelques fragments sont prélevés pour l'examen histologique. Ces fragments, ainsi que ceux prélevés avant la culture, sont fixés dans une solution contenant de l'acide acétique, du formol, et de l'alcool éthylique (5 : 20 : 75). La coloration est effectuée par le réactif de Masson (hématoxyline-phloxine-safran alcoolique).

Les fragments restant sont lavés trois fois dans une solution de NaCl 0,9 %. Sur une partie des fragments, on fait l'analyse chromatographique, les autres fragments sont utilisés pour l'étude des iodoprotéines thyroïdiennes.

DOSAGE DE L'IODE STABLE (^{127}I).

Nous avons utilisé la méthode classique de dosage de ^{127}I, basée sur l'activité catalytique de l'iode dans la réduction des sels

cériques par l'anhydride arsénieux. Les tissus thyroïdiens (20 mg environ) ont été dissous dans NaOH 4N. La minéralisation des échantillons et le dosage de ^{127}I ont été effectués à l'autoanalyseur Technicon.

REPARTITION DE L'IODE RADIOACTIF DANS LES DIFFERENTS COMPOSES IODES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE.

La composition des tissus thyroïdiens en acides aminés iodés marqués a été déterminée par chromatographie sur papier, après hydrolyse à la Pronase (Calbiochem) (enzyme de Streptomyces griseus).

Les tissus thyroïdiens (20 à 50 mg) sont homogénéisés au Potter, dans 300 μl d'une solution de Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane 0,05 M dans NaCl 0,9 %, pH 8. Le taux de fixation de l'iode radioactif (^{131}I et/ou ^{125}I) par les tissus thyroïdiens est alors mesuré en comptant simultanément un aliquot de cet homogénat et de la solution-témoin d'iode radioactif (^{131}I ou ^{125}I), administré au malade ou introduit dans le milieu de culture.

On ajoute ensuite à l'homogénat 50 μl d'une solution de Pronase dans le tampon Tris-NaCl (50 mg/ml de tampon) et une goutte de toluène. L'hydrolyse est effectuée à 37° pendant 6 heures (TONG et coll. 1963).

L'hydrolysat est alors déposé sur du papier à chromatographie (WHATMANN 3 MM), et la chromatographie ascendante est effectuée immédiatement, afin d'éviter la désiodation (TAUROG 1963), dans un mélange collidine (triméthyl-2-4-6-pyridine) et NH_4OH 3N (100 : 37). La collidine (Prolabo) a été redistillée avant l'emploi. Ce solvant permet une séparation satisfaisante, à la fois des iodotyrosines (MIT et DIT) et des iodothyronines (T_4 et T_3). La teneur en T_3 étant assez faible, nous avons généralement déterminé l'ensemble $T_4 + T_3$.

Les chromatogrammes ont été révélés par autoradiographie sur films Kodirex (Kodak). Les bandes de papier correspondant aux taches ont été découpées et leur radioactivité mesurée au compteur à scintillation (compteur-puits).

MESURE DE LA RADIOACTIVITE ^{131}I ET ^{125}I.

Les comptages de radioactivité ^{131}I ou ^{125}I ont été effectués par spectrométrie γ. Dans les cas où les tissus thyroïdiens étaient marqués à la fois à ^{131}I et à ^{125}I, nous avons effectué 2 comptages, aux seuils correspondants aux pics respectifs du ^{131}I et du ^{125}I. La détection de ^{131}I ne subit pas l'interférence du ^{125}I. Par contre, nous avons soustrait du comptage de ^{125}I la fraction de ^{131}I qui apparaît au seuil du ^{125}I. Cette fraction a été déterminée pour chaque comptage, à l'aide d'une solution étalon de ^{131}I comptée dans les deux conditions : elle est de l'ordre de 30 %.

MESURE DE LA RADIOACTIVITE ^{14}C.

Les comptages de radioactivité ^{14}C ont été effectués dans un compteur à scintillation liquide (Packard). Les échantillons aqueux ont été déposés sur des rondelles de papier (papier à chromatographie Whatmann 3 MM), placée au fond des flacons de comptage. Après avoir éliminé complètement l'eau par séchage à l'étuve, on verse dans chaque flacon 10 ml de liquide scintillant. Le liquide scintillant a été préparé par dissolution de 42 ml de Liquifluor dans 1 litre de toluène (concentration finale : 4 g de PPO et 50 mg de POPOP par litre).

RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

Les courbes de relargage des protéines solubles thyroïdiennes ont été établies selon la méthode décrite par DERRIEN, MICHEL et ROCHE (1948) :

Les tissus thyroïdiens (500 mg à 1 g) sont congelés, puis découpés en tranches minces que l'on met en suspension pendant 24 heures dans du NaCl 0,9 % à + 4° (2ml de sérum physiologique par gramme de tissu). On centrifuge ensuite à 4,000 g pendant 20 minutes, et on prélève le surnageant.

L'extrait protéique est alors soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium à concentration croissante : on prépare une solution aqueuse de sulfate d'ammonium, saturée (760 g/l), à pH 6,5. Dans une série de 10 tubes à centrifuger Sorvall, on met un même volume (0,1 ml) d'extrait protéique, puis des volumes variables d'eau distillée et de solution saturée de sulfate d'ammonium, de façon à établir une gamme de 0 à 90 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le volume final est de 1 ml pour chaque tube. Les mélanges sont agités, puis maintenus à 22° pendant 16 heures. On centrifuge alors à 30.000 g pendant 20 minutes à 22° (centrifugeuse Sorvall).

On prélève un aliquot de chaque surnageant (0,5 ml), dont on mesure la radioactivité, puis, après dilution à 2 ml avec de l'eau distillée, on mesure l'absorption en UV à 270 mμ. Les valeurs obtenues pour chaque surnageant sont exprimées en % de l'extrait total. Les courbes de solubilité sont établies en portant en abscisse la concentration en sulfate d'ammonium et en ordonnée le pourcentage de radioiode et d'azote protéique en solution.

ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE.

Les profils de sédimentation des protéines solubles thyroïdiennes ont été établis selon la méthode décrite par SALVATORE et coll. (1964) :

Les tissus thyroïdiens (20 à 100 mg) ont été homogénéisés au Potter, dans 0,5 ml de tampon Tris-HCl de pH 7,4 (0,05 M Tris - 0,1 M NaCl). On centrifuge ensuite à 4.000 g pendant 20 minutes,

et on prélève le surnageant. Dans les cas où les tissus thyroïdiens étaient marqués en culture (à ^{125}I ou au ^{14}C), les surnageants ont été dialysés pendant 24 heures, à + 4°, contre le tampon Tris - HCl pH 7,4, afin d'éliminer l'éxcès de marqueur radioactif non incorporé dans les protéines.

Les extraits protéiques obtenus ont été soumis à une ultra-centrifugation en gradient de saccharose, selon la méthode décrite par MARTIN et AMES (1961). Le gradient de saccharose 5-20 % a été préparé dans du tampon Tris - HCl pH 7,4, dans des tubes en nitrate de cellulose (Beckmann) de 5 ml, à l'aide d'un appareil à gradients Büchler. La solution protéique (100 μl) est alors déposée à la surface du gradient, et la centrifugation est effectuée aussitôt. Les centrifugations ont été faites à l'aide du rotor SW 65 d'une ultra-centrifugueuse Spinco L2, à 125.000 g pendant 5 heures 30.

Après la centrifugation, le fond du tube est percé à l'aide d'une aiguille, et l'on recueille goutte à goutte environ 40 fractions de 2 gouttes chacune. Sur chaque fraction, on mesure la radioactivité, et l'absorption en UV à 280 mμ. Les profils de sédimentation sont établis en portant en abscisse le numéro des fractions, et en ordonnée la radioactivité de chaque fraction (en coups par minute, ou en pourcentage de la radioactivité totale de l'extrait).

MESURE DE LA TENEUR EN THYROGLOBULINE (Tg) ET EN FRACTIONS LEGERES 3-8 S DES TISSUS THYROÏDIENS.

La mesure de la teneur en protéines solubles des tissus thyroïdiens a été effectuée par lecture de l'absorption en UV à 280 mμ, la courbe de référence étant établie avec une solution de sérumalbumine humaine. Les proportions de Tg et de fractions légères dans les protéines solubles ont été déterminées sur les profils de sédimentation en UV, par planimétrie.

MESURE DU TAUX D'IODATION DE LA THYROGLOBULINE (Tg) ET DES FRACTIONS LEGERES.

La Tg et les fractions légères 3-8 S ont été isolées à partir de gradients de saccharose, en rassemblant les fractions

correspondantes aux pics respectifs de Tg et de fractions légères 3-8 S. Les dosages de protéines et d'iode stable (^{127}I) sont alors effectués sur ces fractions. Les résultats sont exprimés en µg de ^{127}I par 100 µg de protéines.

ELECTROPHORESES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

Les extraits thyroïdiens et les fractions légères 3-8 S isolées à partir de gradients de saccharose ont été soumises à des électrophorèses en gel de polyacrylamide, selon la méthode décrite par DAVIS (1964).

Les gels de polyacrylamide sont préparés extemporanément par polymérisation d'acrylamide et de NN' - méthylène - bis - acrylamide (Canalco), en présence de persulfate d'ammonium. Les gels sont moulés dans des tubes de verre verticaux, de 5 mm de diamètre et 12 cm de long. Nous avons utilisé des gels à 5 %, 7 %, ou 10 % d'acrylamide, les gels à 10 % donnant une meilleure séparation des protéines de faible poids moléculaire. Dès que la polymérisation est effectuée, les échantillons protéiques (environ 300 µg de protéines), en solution dans du tampon Tris - HCl (pH 7,4), sont déposés à la surface du gel.

L'appareillage comprend un redresseur de courant (Apelab) de 200 mA (450 volts), et un appareil à électrophorèse (Apelab) permettant la migration simultanée de 12 échantillons. La migration est effectuée dans du tampon Tris-glycocolle pH 8,4. Le tampon est réparti dans les deux réservoirs ; du bleu de bromophénol ajouté au tampon du réservoir supérieur (cathode) permet de repérer le front de migration. Le courant est maintenu à 5 mA par tube. La durée de la migration (4 à 5 heures) varie selon la concentration du gel.

Après la migration, les tubes de verre sont cassés avec précaution à l'aide d'un étau, et les gels libérés sont colorés au noir amide. Le colorant en excès est ensuite éliminé par de l'acide acétique à 7,5 %. Les bandes protéiques sont alors révélées.

Les gels peuvent être découpés en tranches d'égale épaisseur (2 mm) pour la mesure de la radioactivité, ou placés dans un microdensitomètre (Apelab) pour la lecture de l'absorption optique.

DETERMINATION DES POIDS MOLECULAIRES.

Les poids moléculaires des différentes fractions obtenues par électrophorèse en gel de polyacrylamide ont été déterminés grâce à la relation existant entre la migration électrophorétique d'une protéine et le logarithme de son poids moléculaire. Nous avons utilisé deux méthodes différentes :

- Dans la méthode de SHAPIRO et coll. (1967), les protéines sont dénaturées et réduites par du dodécylsulfate de sodium SDS (1 %) et du mercaptoéthanol (1 %), et la migration électrophorétique est effectuée comme précédemment, mais en présence de SDS (0,1 %) dans les gels et dans le tampon Tris-glycocolle.

- Dans la méthode de ZWAAN (1967), on mesure le rapport des mobilités des protéines dans deux gels de concentrations différentes (7 % et 10 %) (quotient de retard).

Pour chacune des deux méthodes, on établit une courbe de référence avec des protéines de poids moléculaires connus (thyroglobuline humaine, sérumalbumine humaine, prolactine, trypsine), et on reporte sur cette courbe les valeurs obtenues pour chacune des bandes protéiques dont on veut mesurer le poids moléculaire.

FOCALISATION ISOELECTRIQUE.

Les fractions légères 3-8 S, isolées à partir de gradients de saccharose, ont été soumises à une focalisation isoélectrique selon la méthode décrite par WRIGLEY (1968).

Les migrations électrophorétiques sont effectuées sur un support de gel de polyacrylamide, en présence d'Ampholine (LKB). Nous avons utilisé des gels d'acrylamide à 7 % et de l'Ampholine de pH 3-10. Les gels comprennent un mélange d'acrylamide, de NN' - méthylène - bis - acrylamide et d'ampholine. On ajoute les échantillons protéiques (500 μg environ), en solution dans le tampon Tris-HCl (pH 7,4), puis du persulfate de potassium. Les gels sont alors polymérisés dans des tubes de verre.

La focalisation isoélectrique est effectuée dans l'appareil à électrophorèse, mais la cuve d'électrophorèse contient alors de l'acide sulfurique à 0,2 % dans le réservoir supérieur (anode), et de l'éthanolamine à 0,4 % dans le réservoir inférieur (cathode). Le courant est maintenu à 0,5 mA par tube pendant 24 heures environ, temps nécessaire pour obtenir une séparation satisfaisante des protéines thyroïdiennes légères 3-8 S. Il se produit alors un gradient de pH, et les protéines sont séparées en bandes de précipitations différentes suivant leurs points isoélectriques.

Les tubes de verre sont alors cassés à l'aide d'un étau, et les gels libérés sont fixés dans de l'acide trichloracétique à 5 %. Pour chaque migration, une courbe témoin de pH est établie sur un gel sans protéines; ce gel est coupé en segments de 0,5 cm que l'on laisse en contact avec 5 ml d'eau pendant quelques heures, et le pH de cette eau est ensuite mesuré à l'aide d'un pH mètre.

RESULTATS

A - HORMONOGENESE THYROIDIENNE

Nous avons étudié l'hormonogénèse thyroïdienne dans des tissus thyroïdiens humains, marqués à l'iode radioactif in vivo ou en culture organotypique.

I - ETUDES IN VIVO.

Divers travaux antérieurs ont montré que la concentration en iode stable (^{127}I) et le pourcentage d'hormones thyroïdiennes marquées à ^{131}I sont très variables dans les tissus thyroïdiens. Nous avons étudié différents tissus thyroïdiens, normaux et pathologiques, et nous avons recherché s'il existe une corrélation entre la concentration en iode stable d'un tissu thyroïdien et la synthèse hormonale. De plus, nous avons cherché à suivre l'évolution dans le temps de la teneur en hormones marquées. Pour cela nous avons employé la méthode de double marquage in vivo à ^{131}I et ^{125}I (HÖFER 1963), ^{131}I étant administré 24 heures avant l'opération, et ^{125}I plusieurs jours avant l'intervention. Ce double marquage donne des renseignements équivalents à ceux qui seraient obtenus si deux prélèvements successifs pouvaient être effectués sur le même patient, l'un 24 heures après le marquage, l'autre plusieurs jours après le marquage. Nous nous sommes demandés en effet si la radioactivité incorporée dans les hormones thyroïdiennes augmente avec le temps, en particulier dans les cas où le pourcentage d'hormones marquées est faible à la 24ème heure après le marquage.

1° - Etude de l'hormonogénèse thyroïdienne après marquage à ^{131}I (24ème heure).

Nous avons étudié la répartition de ^{131}I dans les différents composés iodés séparés par chromatographie, dans divers tissus

TABLEAU I

Tissus étudiés et nombre de cas	^{127}I µg/g (moyenne)	Fixation ^{131}I par g % dose ingérée (moyenne)	^{131}I en % dans les chromatogrammes			
			MIT	DIT	$T_4 + T_3$	$\frac{MIT}{DIT}$
Tissus "normaux" (9 cas)	468 ± 56	2,6 ± 0,3	40,2 ± 2,3	41,6 ± 1,9	8,6 ± 1,1	0,9 ± 0,3
Adénomes (10 cas)	104 ± 22	0,6 ± 0,1	53,4 ± 3,3	33,1 ± 3,2	4,2 ± 0,8	1,9 ± 0,5
Hyperthyroïdies traitées par antithyroïdiens (7 cas)	155 ± 47	1,1 ± 0,2	49,2 ± 3,7	30,2 ± 3,4	6,6 ± 1,9	1,8 ± 0,3
Goîtres simples (5 cas)	108 ± 34	0,7 ± 0,2	63,0 ± 3,9	25,4 ± 3,2	3,6 ± 1,9	2,6 ± 0,4
Goîtres avec troubles de l'hormonogénèse D.	196	1,8	17,5	47,6	4,7	0,4
G.	47	0,7	25,5	42,6	4,3	0,6

Analyse de divers tissus thyroïdiens humains, marqués à ^{131}I in vivo (24ème heure) : concentration en iode stable (^{127}I) par gramme de tissu ; taux de fixation de ^{131}I par gramme de tissu, en % de la dose ingérée ; répartition de ^{131}I dans les différents composés iodés marqués séparés par chromatographie sur papier.

thyroïdiens humains (33 fragments). Nous avons déterminé également la concentration en iode stable (^{127}I) et le taux de fixation de ^{131}I par gramme de tissu (en % de la dose ingérée).

Dans les tissus "normaux" (tableau I), la teneur en iode stable (^{127}I) est de l'ordre de 500 µg par gramme de tissu (en moyenne). La fixation de ^{131}I par gramme de tissu à la 24ème heure après le marquage est en moyenne de 2,6 % de la dose ingérée. L'étude de chromatographique des composés iodés marqués montre la présence, à la 24ème heure après le marquage (^{131}I) de 3-monoiodotyrosine (MIT), et de 3,5-diiodotyrosine (DIT), de 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) et de 3,5,3',5'-tétraiodothyronine ou thyroxine (T_4), d'iodures, et de petits peptides restant à l'origine du chromatogramme. Dans les tissus "normaux", le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ marquées à ^{131}I est proche de 1 (0,9 en moyenne), et le pourcentage d'hormones T_4 et T_3 marquées est de 8,6 en moyenne.

Dans les tissus pathologiques, la teneur en iode stable (^{127}I) et le taux de fixation de ^{131}I sont nettement inférieurs à ceux des tissus normaux (tableau I). La composition en acides aminés iodés marqués est très différente de celle des tissus "normaux", puisque le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ marquées à ^{131}I est toujours supérieur à 1 : il est en moyenne de 1,9 dans les cas d'adénomes et d'hyperthyroïdies traitées par antithyroïdiens, et de 2,6 dans les goitres simples. Dans les adénomes et les goitres, le pourcentage d'hormones T_4 et T_3 marquées est inférieur à celui des tissus "normaux".

Dans 2 cas de goitres avec troubles de l'hormonogénèse, la composition en acides aminés iodés marqués est tout-à-fait différente de celle des autres tissus pathologiques (tableau I). En effet, le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ marquées à ^{131}I est inférieur à 1 (0,4 et 0,6). Mais le pourcentage d'hormones T_4 et T_3 marquées est inférieur à la normale (4,7 et 4,3). En outre, une proportion importante de peptides marqués (20 et 21 %, au lieu de 5 % dans les tissus "normaux") résiste à l'hydrolyse et reste à l'origine des chromatogrammes. Ces deux tissus goitreux forment donc une exception parmi l'ensemble

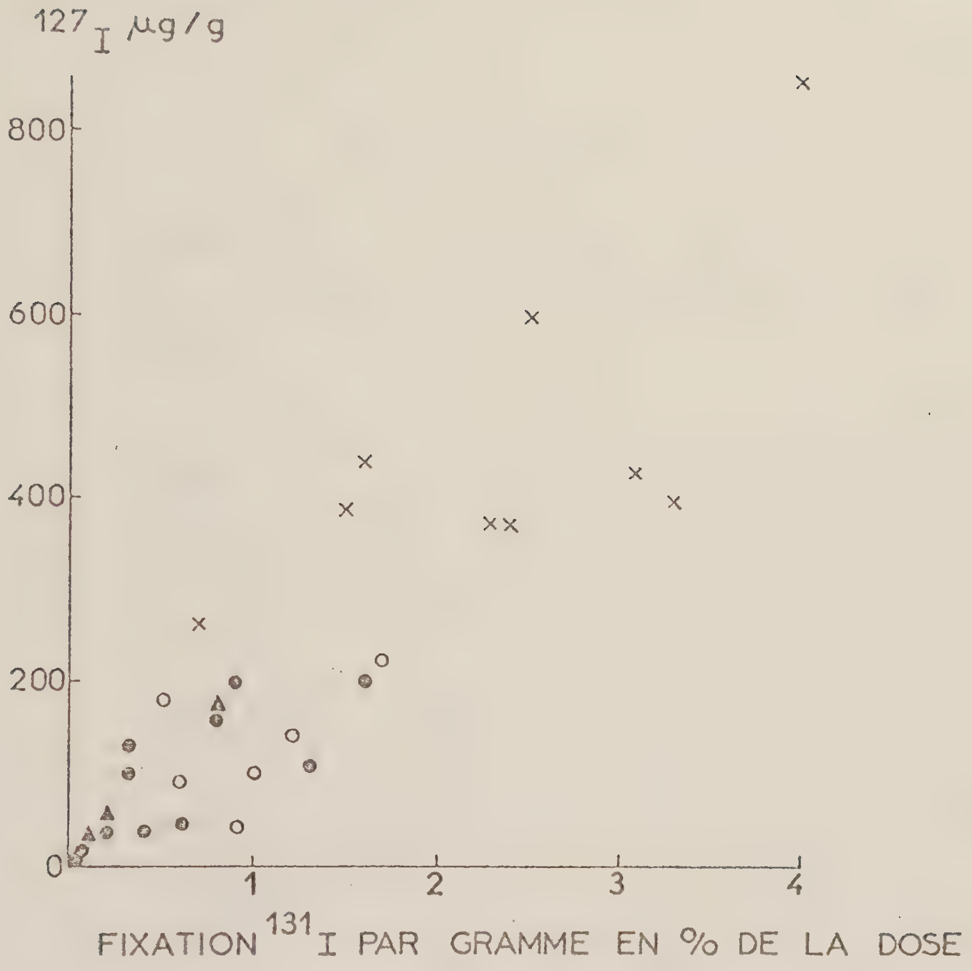


Figure 1.- Relation entre la concentration en iode stable du tissu thyroïdien (en µg de 127 I par gramme de tissu), et le taux de fixation de l'iode radioactif (131 I) par gramme de tissu, exprimé en % de la dose ingérée.

Les différents points correspondent à des fragments thyroïdiens différents, prélevés chez des malades opérés pour divers troubles de la glande thyroïde, ayant reçu une dose traceuse (250 µCi) de ^{131}I 20 à 24 heures avant l'intervention chirurgicale.

- x tissus normaux.
- ● adénomes
- o hyperthyroïdies traitées par antithyroïdiens
- ▲ goitres.

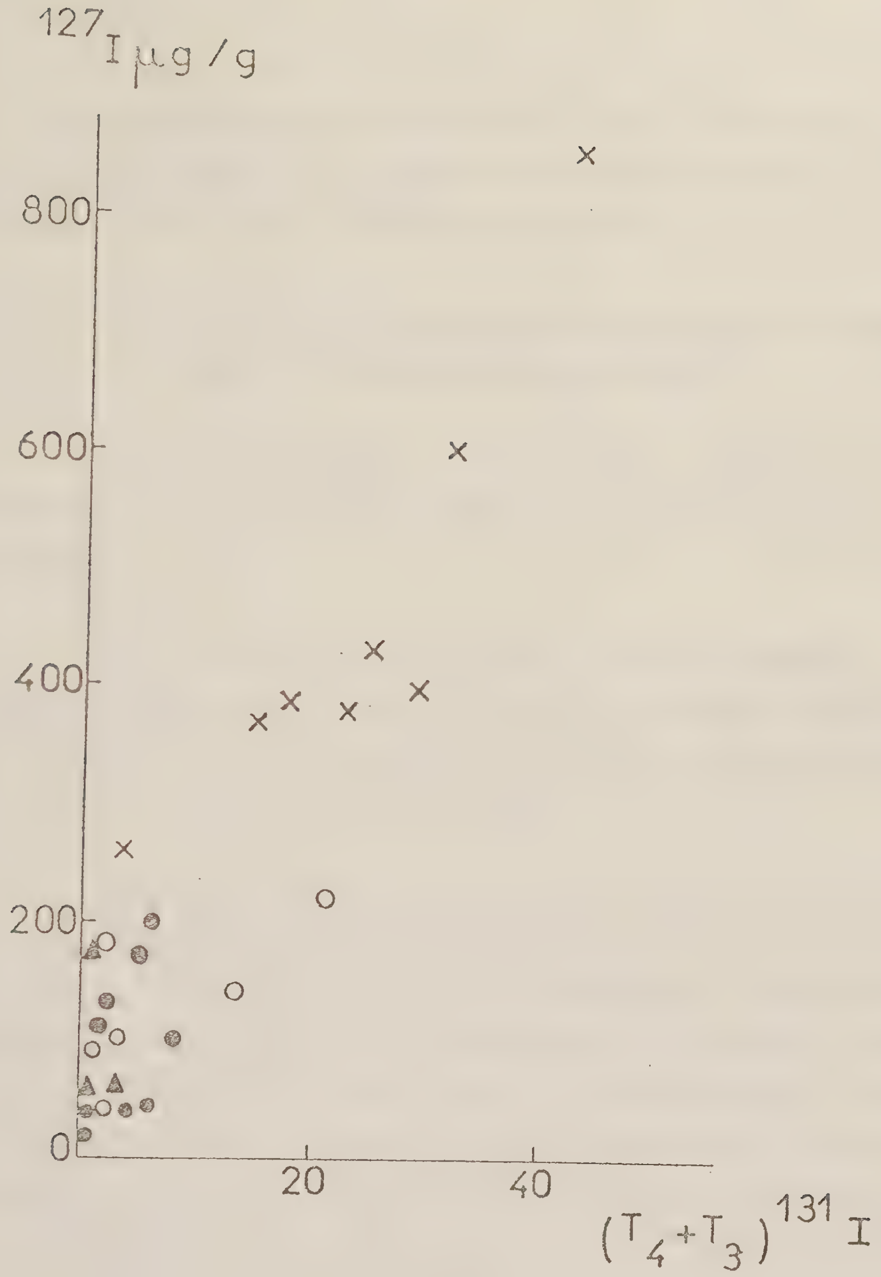


Figure 2.-

Relation entre la concentration en iode stable du tissu thyroïdien (en µg de 127I par gramme de tissu), et la quantité d'hormones thyroïdiennes (T4 + T3) marquées à l'iode radioactif (131 I).

Les points correspondent aux mêmes fragments que ceux de la figure 1. Les quantités d'hormones marquées des différents tissus thyroïdiens ont été calculées en multipliant les pourcentages d'iodothyronines (T4 + T3), séparées par chromatographie sur papier, par les taux de fixation de l'iode radioactif (131I), à la 24ème heure après le marquage. Les quantités d'hormones (T4 + T3) marquées sont exprimées en % de la dose ingérée, multiplié par 100, par gramme de tissu.

des tissus thyroïdiens que nous avons étudiés. Nous verrons, dans le chapitre concernant les iodoprotéines thyroïdiennes, que ces deux goitres présentent d'autres anomalies.

2° - Relation entre la synthèse hormonale et la teneur en iode (^{127}I) des tissus thyroïdiens.

Nous avons recherché s'il existe une corrélation entre la synthèse hormonale et la teneur en iode stable (^{127}I) d'un tissu thyroïdien.

Nous avons établi, dans divers tissus thyroïdiens, normaux et pathologiques, qu'il existe une relation linéaire entre la teneur en iode stable (^{127}I) d'un tissu thyroïdien et sa capacité de fixation de l'iode radioactif (^{131}I) (Fig. 1).

Nous avons calculé la proportion d'iode radioactif apparaissant sous forme hormonale (T_4 et T_3), en multipliant par le taux de fixation de ^{131}I le pourcentage d'iodothyronines séparées par chromatographie. Dans les tissus pathologiques, la quantité d'hormones T_4 et T_3 marquées à la 24ème heure est très inférieure à celle des tissus "normaux". Quel que soit le tissu thyroïdien, la quantité d'hormones T_4 et T_3 marquées est d'autant plus grande que la teneur en iode stable (^{127}I) du tissu est plus élevée (Fig. 2). La teneur en iode (^{127}I) d'un tissu thyroïdien est donc un facteur important de l'hormonogénèse thyroïdienne.

3° - Cinétique de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes.

Par le double marquage in vivo à ^{131}I et ^{125}I, nous avons pu suivre l'évolution dans le temps de la quantité d'hormones marquées, dans l'intervalle de quelques jours séparant les deux marquages, ^{131}I étant administré 24 heures avant l'opération, et ^{125}I plusieurs jours (de 2 à 21 jours) avant l'intervention (Fig. 3).

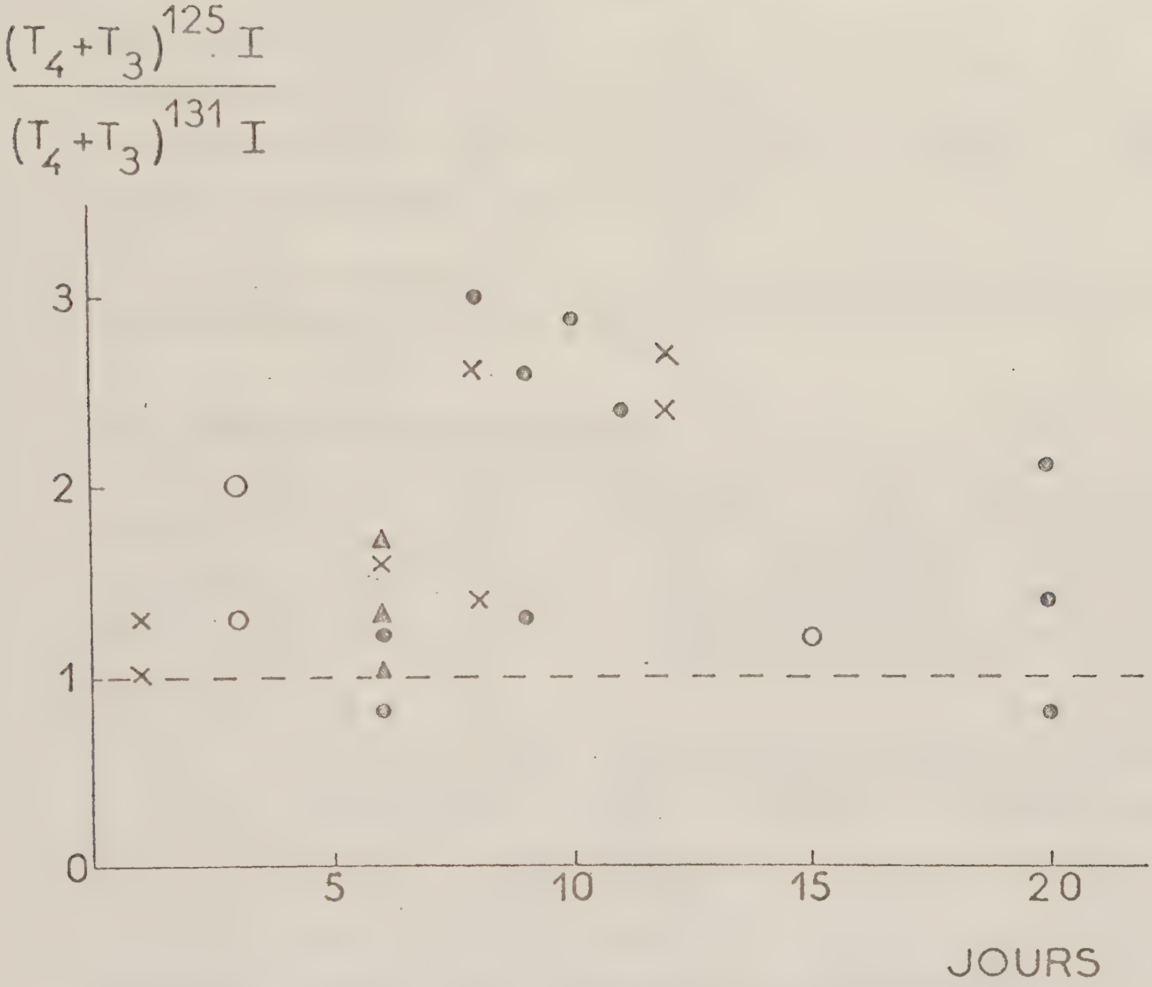


Figure 3.- Evolution de la quantité d'hormones (T4 + T3) marquées en fonction du temps. En ordonnée, rapport entre les quantités d'iodothyronines marquées au 125 I et celles marquées au 131 I (en % de la dose ingérée, multiplié par 100, par gramme de tissu). En abscisse, temps écoulé entre l'administration du 125 I et celle du 131 I.

Les points correspondent aux mêmes fragments que ceux de la figure 1. Les patients ont reçu un double marquage isotopique : 250 µCi de 131 I a été administré 20 à 24 heures avant l'intervention chirurgicale, et 250 µCi de 125 I à des temps variables avant l'opération (2 à 21 jours).

La proportion de ^{125}I incorporée dans les hormones $(T_4 + T_3)$ marquées à ^{125}I est plus élevée que celle de ^{131}I $(T_4 + T_3)$ marquées à ^{131}I. En effet, la figure 3 montre que, quel que soit l'intervalle de temps séparant les deux marquages (de 1 à 20 jours), le rapport $\frac{(T_4 + T_3) \text{ marquées à } ^{125}I}{(T_4 + T_3) \text{ marquées à } ^{131}I}$ est supérieur à 1, aussi bien pour les tissus "normaux" que pour les tissus pathologiques, à l'exception de 4 cas. La quantité d'hormones T_4 et T_3 marquées augmente donc avec le temps, même dans les cas où celle-ci est très faible à la 24ème heure après le marquage.

Il s'agirait donc, dans les tissus pathologiques, d'un ralentissement de la synthèse hormonale.

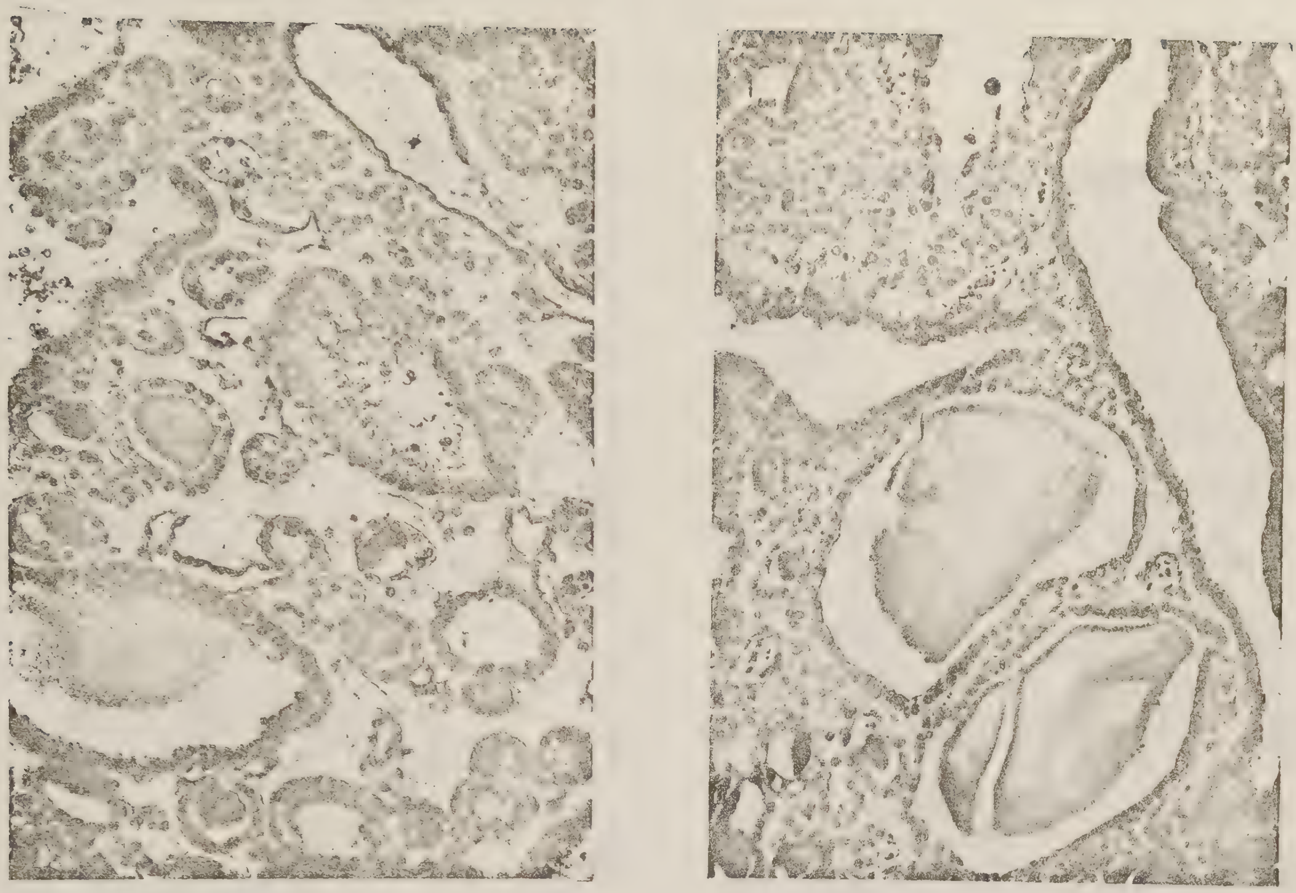
II - ETUDES EN CULTURE ORGANOTYPIQUE.

Certains tissus thyroïdiens pathologiques, en particulier les tissus cancéreux, fixent très peu l'iode radioactif administré aux patients in vivo (^{131}I). Les tissus thyroïdiens sont dans ces cas trop peu radioactifs pour qu'on puisse effectuer l'analyse chromatographique.

C'est pourquoi nous avons poursuivi ces études en utilisant la culture organotypique de fragments thyroïdiens. Cette méthode permet en effet de marquer les tissus thyroïdiens avec des concentrations assez élevées d'iode radioactif (^{125}I), ou d'isotopes à vie longue (^{14}C), qu'il serait dangereux d'administrer aux malades in vivo. Cette méthode a, de plus, l'avantage de pouvoir être prolongée pendant plusieurs jours, alors qu'en incubation dans le milieu de Krebs - Ringer le tissu thyroïdien ne peut survivre que pendant un temps relativement court (quelques heures). Enfin, on peut ajouter dans le milieu de culture diverses substances, comme la TSH, capables d'agir sur le métabolisme de l'iode.

Des travaux antérieurs effectués au laboratoire (Nataf et coll., 1966) ont montré que dans 80 % des cas l'intégrité morphologique du tissu thyroïdien humain est maintenue en culture pendant quelques jours, et que le tissu thyroïdien métabolise le radioiode ajouté en culture, mais de façon moins efficace qu'in vivo.

Dans ces études, les fragments thyroïdiens avaient été maintenus en culture pendant 7 jours. Dans notre étude, nous n'avons pas cherché à cultiver le tissu thyroïdien aussi longtemps, mais à étudier

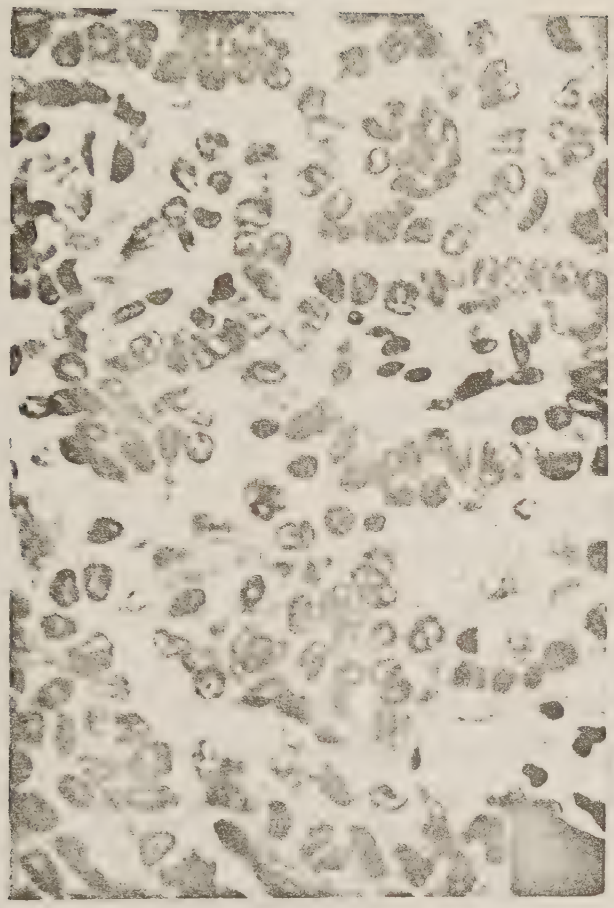


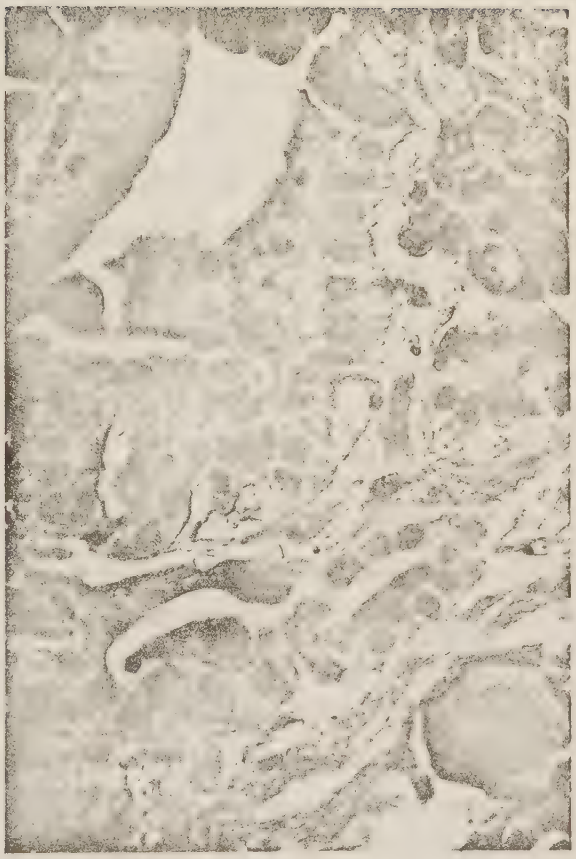
Avant culture

Après culture
(4ème jour)

Figure 4.-
Adénome thyroïdien de type vésiculaire.
(Hématoxyline - phloxine - safran alcoolique de Masson, x 200).
A gauche : fragment immédiatement prélevé sur la pièce opératoire.

A droite : inclusion d'un fragment maintenu en culture organotypique pendant 4 jours (milieu NCTC, enrichi de 5 % de sérum de poulain). La structure vésiculaire est nettement conservée sur les 2 fragments, avec une absence quasi-totale de nécrobiose sur celui en culture.





Avant culture

Après culture

(5ème jour)

Figure 5.-

Epithélioma papillaire.

(Hématoxyline - phloxine - safran alcoolique de Masson, x 500).

A gauche : fragment immédiatement prélevé sur la pièce opératoire.

A droite : inclusion d'un fragment après culture de 5 jours. La morphologie cellulaire parait très bien conservée. On retrouve sur les deux clichés, en bas et à droite, un calcosphérite.

le métabolisme thyroïdien dans des conditions satisfaisantes. La durée de nos cultures a donc été de deux à cinq jours. A des temps variables avant la fin de la culture (2 heures ou 24 heures), on introduit stérilement dans chaque boîte de Pétri 25 µCi de ^{125}I. En fin d'expérience, les fragments sont lavés dans du NaCl 0,9 %.

1° - Résultats histologiques.

Un examen histologique est effectué sur des fragments thyroïdiens avant la mise en culture et sur des fragments cultivés. La structure histologique des tissus thyroïdiens est généralement très hétérogène. De ce fait, la comparaison entre les fragments fixés immédiatement après leur prélèvement sur la pièce opératoire et ceux cultivés est parfois difficile (B. Nataf, E. Malaise, M. Tubiana et R. Gérard-Marchant, 1966).

Dans la grande majorité des cas, nous avons trouvé dans les fragments cultivés des images comparables à celles des témoins. La figure 4 montre, à titre d'exemple, l'aspect histologique d'un adénome vésiculaire au moment du prélèvement et après 4 jours de culture. En ce qui concerne les tissus cancéreux, la culture est moins satisfaisante que celle des adénomes bénins. Cependant, l'ensemble de nos résultats prouve que l'on peut cultiver pendant quelques jours des cancers thyroïdiens sans modifier l'aspect histologique (figure 5).

2° - Métabolisme de ^{125}I ajouté en culture.

Nous avons étudié l'incorporation de ^{125}I ajouté au milieu de culture dans les différents composés iodés séparés par chromatographie.

Dans les tissus "normaux", après 2 à 3 jours de culture et 24 heures de marquage à ^{125}I, le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ marquées est en moyenne de 3,0 (tableau II) ; la proportion de T_4 et T_3 marquées est inférieure à celle obtenue après 24 heures de marquage in vivo (tableau I et II). Ainsi les tissus thyroïdiens ne métabolisent pas l'iode radioactif aussi efficacement en culture qu'in vivo.

Cependant, dans des cas de cancers thyroïdiens pour lesquels la fixation in vivo (^{131}I) était trop faible pour permettre l'analyse chromatographique, le marquage en culture (^{125}I) a permis d'obtenir des renseignements sur le métabolisme de l'iode (tableau II). Parmi

TABLEAU II

Tissus étudiés et nombre de cas.	Fixation ^{125}I par 10 mg en % de la dose ajoutée au milieu	^{125}I en % dans les chromatogrammes				
		MIT	DIT	$T_4 + T_3$	I^-	$\frac{MIT}{DIT}$
Tissus "normaux" (7 cas)	1,0 ± 0,3	37,7 ± 5,4	13,6 ± 2,2	3,0 ± 0,5	39,9 ± 6,4	3,0 ± 0,3
Cancers Thyroïdiens (13 cas)	0,01 ± 0,002	29,7 ± 5,3	7,4 ± 1,8	3,1 ± 0,5	45,1 ± 5,9	7,0 ± 1,7

Analyse de tissus thyroïdiens humains, marqués à ^{125}I en culture organotypique (24 heures de marquage) :

Taux de fixation de ^{125}I par 10 mg de tissu, en % de la dose ajoutée au milieu de culture, et répartition de ^{125}I dans les différents composés iodés marqués séparés par chromatographie sur papier.

les 17 cancers étudiés, nous avons noté dans 4 cas un métabolisme très déficient, puisque la majeure partie (95 %) du radioiode fixé par le tissu cancéreux reste sous forme d'iodures, et que l'on trouve seulement 3 à 5 % de MIT et des traces de DIT et d'hormones marquées. Dans les 13 autres fragments de cancers thyroïdiens rassemblés dans le tableau II, le métabolisme du radioiode ajouté en culture est nettement meilleur que dans les 4 cas précédents (45 % seulement de ^{125}I retrouvé sous forme d'iodures) ; le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ est cependant plus élevé que dans les tissus normaux. Bien que le pourcentage d'hormones T_4 et T_3 marquées soit analogue à celui des tissus "normaux" (3,1 % en moyenne), il est important de signaler que la fixation de ^{125}I est très inférieure à la normale (de l'ordre de 100 fois). La radioactivité ^{125}I incorporée dans les hormones T_4 et T_3 (en % de la dose ajoutée au milieu) est très faible par rapport à la normale. Les tissus cancéreux sont donc capables d'effectuer la synthèse hormonale, mais les hormones T_4 et T_3 sont très faiblement marquées à ^{125}I en culture.

B - CARACTERES DES IODOPROTEINES THYROIDIENNES.

Les hormones thyroïdiennes se formant au sein même des molécules de thyroglobuline, nous avons entrepris l'étude des iodoprotéines thyroïdiennes, et plus particulièrement de la thyroglobuline (Tg). Nous avons recherché, dans les tissus thyroïdiens pathologiques, des modifications éventuelles de ces iodoprotéines.

Les tissus thyroïdiens ont été marqués à l'iode radioactif, soit in vivo (administration de ^{131}I aux patients) ; soit en culture organotypique (marquage à ^{125}I).

I - ETUDES IN VIVO.

Nous avons étudié les iodoprotéines au moyen de deux techniques différentes : dans nos premiers travaux, nous avons utilisé le relargage par les sels neutres, qui permet de séparer les protéines suivant leurs caractères de solubilité (DERRIEN, MICHEL, et ROCHE, 1948). Par la suite, la composition en iodoprotéines a été déterminée par ultracentrifugation en gradient de saccharose, méthode qui sépare les molécules protéiques suivant leurs coefficients de sédimentation (MARTIN et AMES, 1961).

1° - Relargage par le sulfate d'ammonium :

Nous avons établi les courbes de relargage pour différents tissus thyroïdiens, afin de déterminer la proportion d'iodoprotéines marquées à ^{131}I in vivo plus solubles que la Tg dans le sulfate d'ammonium. Nous avons recherché si ces iodoprotéines étaient en proportion anormalement élevée dans les cas où le tissu thyroïdien est soumis à une hyperstimulation par la TSH. C'est pourquoi nous avons étudié tout particulièrement les goitres et les glandes thyroïdes soumises à l'action d'antithyroïdiens (hyperthyroïdiens traités par antithyroïdiens avant l'intervention chirurgicale). Nous avons étudié également les glandes thyroïdes de 3 chiens auxquels nous avons administré du propylthiouracile (PTU) pendant 5 à 6 semaines, par voie orale (100 à 200 mg par jour), et nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus sur 3 chiens témoins ayant reçu la même alimentation dépourvue de PTU.

a) Tissus thyroïdiens humains.

La figure 6a montre la courbe de solubilité des iodoprotéines extraites d'un tissu thyroïdien humain "normal" : les pourcentages de ^{131}I et d'azote protéique chutent brusquement entre 35 et 45 % de la saturation en sulfate d'ammonium ; la thyroglobuline précipite dans cette zone étroite de concentration saline. Il ne reste qu'un faible pourcentage (environ 5 %) d'iodoprotéines marquées à ^{131}I en solution à 50 % de la saturation en sel.

Nous avons étudié au moyen du relargage par le sulfate d'ammonium les iodoprotéines extraites de 58 tissus pathologiques différents, parmi lesquels 11 goitres et 17 hyperthyroïdies traitées par antithyroïdiens. Dans la plupart des cas, les courbes de solubilité sont normales, même dans les tissus pathologiques où la synthèse hormonale est très déficiente (rapport $\frac{MIT}{DIT}$ nettement supérieur à 1 et faible teneur en hormones marquées). Nous avons observé cependant une légère augmentation de la proportion des iodoprotéines marquées à ^{131}I solubles à 50 % de la saturation en sel (12 à 20 %) dans 2 cas de thyroïdites de Hashimoto et 2 cas de cancers thyroïdiens.

Enfin, dans 2 cas de goitres exceptionnels avec troubles de l'hormonogénèse (tableau I), les courbes de solubilité sont tout à fait anormales. Dans ces 2 goitres, au lieu d'une précipitation brusque entre 35 et 45 % de la saturation en sel, nous avons observé une précipitation graduelle entre 30 et 90 % de la saturation en sel ; une proportion anormalement élevée (40 à 60 %) des iodoprotéines marquées à ^{131}I reste en solution à 50 % de la saturation en sel (Fig. 6 b). Dans l'un de ces 2 goitres, le relargage, de même que l'analyse chromatographique, a été effectué sur 4 fragments différents : les 4 courbes de solubilité sont anormales. Ces 2 goitres forment donc une exception parmi les 58 tissus pathologiques étudiés par relargage, et parmi les 11 goitres étudiés par cette méthode. Il est important de noter dans ces 2 goitres, dont nous avons déjà discuté le métabolisme iodé, que les hormones T_4 et T_3 sont présentes, mais en faible quantité, et que le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ est nettement inférieur à 1. (Tableau I).

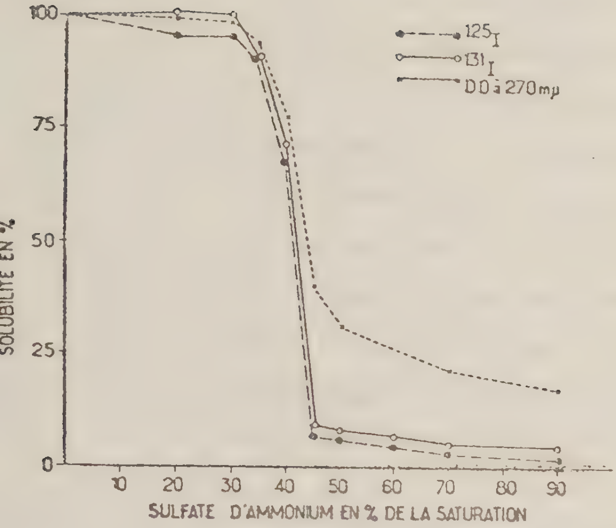


Figure 6a

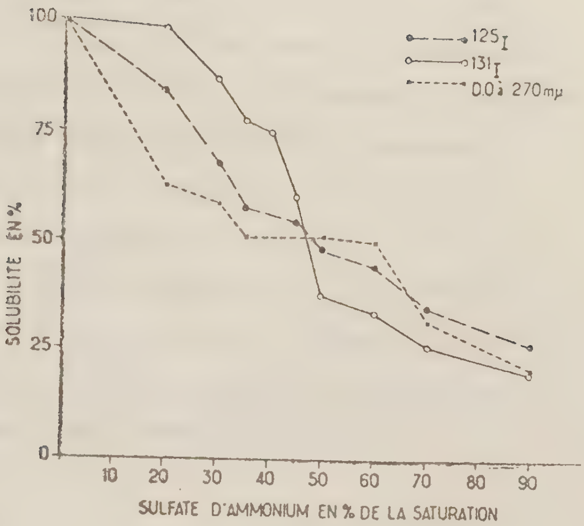


Figure 6b

Figure 6 a.- Courbe de solubilité dans le sulfate d'ammonium des iodoprotéines extraites d'un tissu thyroïdien humain "normal".

En abscisse, concentration en sulfate d'ammonium ; en ordonnée, pourcentage d'iodoprotéines solubles.

La thyroglobuline précipite dans une zone étroite de concentration : entre 35 et 45 % de la saturation en sulfate d'ammonium. Dans ce cas, le patient a reçu un double marquage isotopique : ^{131}I a été administré 24 heures avant l'intervention et ^{125}I 6 jours avant l'opération. La courbe de solubilité des iodoprotéines marquées à ^{131}I et celle des iodoprotéines marquées à 125I sont semblables.

Figure 6 b.- Courbe de solubilité dans le sulfate d'ammonium des iodoprotéines extraites du tissu thyroïdien d'un goître exceptionnel, avec troubles de l'hormonogénèse (goitre G. du tableau I).

Ce malade a reçu un double marquage isotopique. Les iodoprotéines marquées à 131 I (24ème heure) et celles marquées à 125 I (7ème jour) ont les mêmes caractères de solubilité. Une proportion anormalement élevée d'iodoprotéines reste en solution à 50 % de la saturation en sel.

La courbe de solubilité du deuxième cas de goitre avec troubles de l'hormonogénèse (goitre D. du tableau I) est semblable à celle-ci. Dans ces deux goîtres, bien que les courbes de solubilité des iodoprotéines soient anormales, le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ est nettement inférieur à 1 et les hormones T4 et T3 sont présentes.

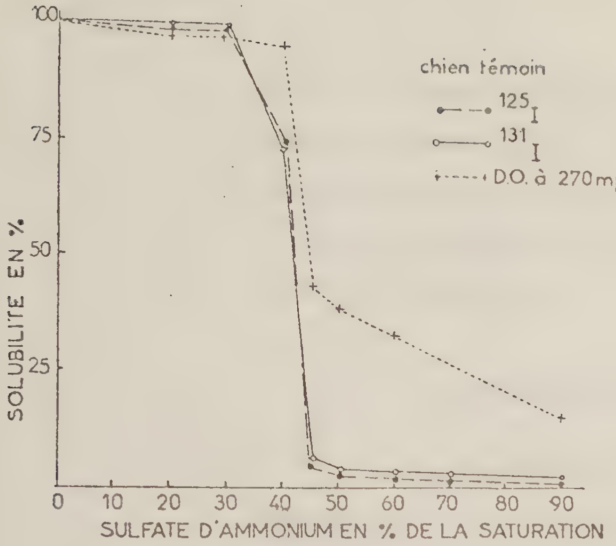
En utilisant la méthode de double marquage, qui nous avait permis de déceler un ralentissement de la synthèse hormonale dans les tissus pathologiques, nous n'avons pas observé de différences importantes entre les courbes de solubilité des iodoprotéines marquées à ^{131}I (24ème heure après le marquage in vivo) et celles des iodoprotéines marquées à ^{125}I (plusieurs jours après le marquage in vivo). Les iodoprotéines marquées à ^{131}I et celles marquées à ^{125}I précipitent de la même façon, quel que soit l'intervalle de temps entre les 2 marquages (entre 1 et 20 jours), et quel que soit le cas pathologique, même dans les cas où les courbes sont anormales (Fig. 6).

b) Chiens traités au PTU.

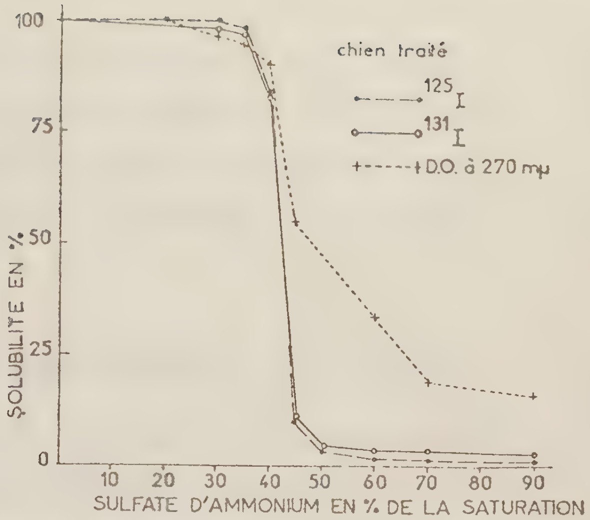
Chez les 3 chiens qui ont reçu du PTU pendant 5 à 6 semaines (100 à 200 mg par jour), nous avons obtenu des courbes de solubilité semblables à celles des chiens témoins ayant reçu la même alimentation dépourvue de PTU (Fig. 7). Pourtant, ce traitement a agi sur les glandes thyroïdes, puisque la teneur en iode stable (^{127}I) des tissus thyroïdiens des chiens traités au PTU était inférieure à celle des chiens témoins, et que les rapports $\frac{MIT}{DIT}$ marquées à ^{131}I ou à ^{125}I étaient plus élevés chez les chiens traités (Fig. 7). Ainsi, chez les chiens traités au PTU, de même que chez les malades hyperthyroïdiens traités aux antithyroïdiens, la proportion des iodoprotéines marquées au ^{131}I ou à ^{125}I solubles dans les fortes concentrations salines n'est pas particulièrement élevée, les courbes obtenues étant normales dans les 2 cas.

2° - Ultracentrifugation en gradient de saccharose :

Nous avons établi les profils de sédimentation en gradient de saccharose des iodoprotéines extraites de divers tissus thyroïdiens, afin d'étudier la répartition des iodoprotéines thyroïdiennes séparées suivant leurs coefficients de sédimentation. Nous avons recherché si on pouvait observer, dans les tissus pathologiques, une augmentation de la proportion des iodoprotéines marquées à ^{131}I in vivo sédimentant plus lentement que la Tg (fraction 3-8 S). Nous avons déterminé, dans



CHIEN TEMOIN



CHIEN TRAITE AU PTU

Figure 7. -
Courbes de solubilité des iodoprotéines thyroïdiennes d'un chien traité au propylthiouracile (PTU) (à droite), et d'un chien témoin (à gauche) ayant reçu la même alimentation dépourvue de PTU.
Chez ce chien traité, de même que chez les 2 autres chiens traités au PTU (100 à 200 mg par jour pendant 5 à 6 semaines), les courbes de solubilité sont semblables à celles des chiens témoins.
Résultats biochimiques correspondants :

Thyroïdes de chiens	^{127}I μg/g tissu	^{131}I (24ème heure)			^{125}I (4ème jour)			$\frac{(T_4+T_3)\ ^{125}I}{(T_4+T_3)\ ^{131}I}$
		MIT/DIT	T_4+T_3 %	Fixation % dose	MIT/DIT	T_4+T_3 %	Fixation % dose	
Chien témoin	242	1,6	15,4	6,9	1,4	23,8	9,5	2,1
Chien traité au PTU	77	2,7	13,1	6,2	2,2	19,7	2,2	0,5

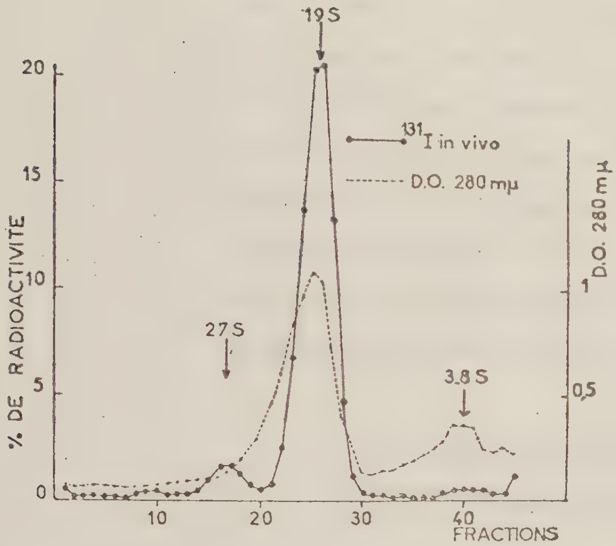
quelques tissus thyroïdiens, les teneurs en Tg (19 S) et en iodoprotéines légères (3-8 S), ainsi que les taux d'iodation (^{127}I) de ces iodoprotéines. Nous avons recherché s'il existe une relation entre le taux d'iodation de la Tg et la teneur en hormones T_4 et T_3 des tissus thyroïdiens.

a) Répartition des iodoprotéines marquées à ^{131}I in vivo.

La figure 8a montre le profil de sédimentation en gradient de saccharose (5-20 %) des iodoprotéines extraites d'un tissu thyroïdien humain "normal" : à la 24ème heure après le marquage, 80 à 85 % de la radioactivité des protéines solubles se trouve dans la thyroglobuline (Tg 19 S), 4 à 7 % dans le dimère 27 S et 3 à 5 % dans les fractions sédimentant plus lentement (fractions légères 3-8 S). Nous n'avons pratiquement pas noté de sous-unité 12 S dans nos extraits thyroïdiens humains, contrairement à ce qu'on observe chez certaines espèces animales (Salvatore et coll. 1965, Lachiver et coll. 1965, Aloj et coll. 1967).

Nous avons étudié par cette méthode 23 tissus thyroïdiens pathologiques, marqués à ^{131}I in vivo. Dans la plupart des cas, les profils de sédimentation sont normaux, même dans les tissus pathologiques où la synthèse hormonale est très faible. Cependant, dans 2 cas de thyroïdites de Hashimoto, nous avons noté une proportion légèrement supérieure à la normale de fractions légères 3-8 S marquées (8 et 14 %). Ces deux cas ont été signalés dans le paragraphe précédent ; ils présentaient également, par relargage, une légère augmentation de la proportion des iodoprotéines plus solubles que la Tg.

Enfin, dans l'un des deux cas de goitres exceptionnels, pour lesquels les courbes de solubilité étaient très anormales, le profil de sédimentation obtenu par ultracentrifugation est aussi tout à fait anormal. En effet, le profil de sédimentation ne montre aucune radioactivité au niveau de la Tg, mais un pic radioactif de fractions légères 3-8 S (Fig. 8b). La composition en acides aminés iodés dans ce goitre a été rapportée au tableau I. On voit que, malgré l'absence de Tg, les hormones T_4 et T_3 sont présentes dans



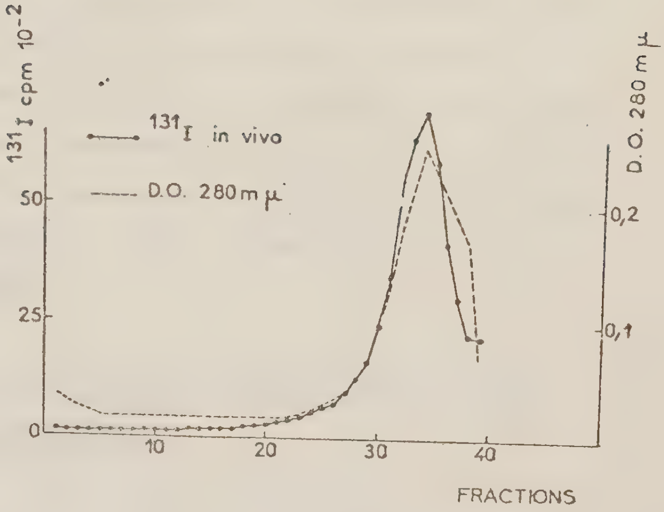


Figure 8 a

Figure 8 b

Figure 8 a.- Profil de sédimentation des iodoprotéines extraites d'un tissu thyroïdien humain "normal", marqué à ^{131}I in vivo (24ème heure).

L'ultracentrifugation en gradient de saccharose (5-20 %) a été effectuée dans le rotor SW 65, à 125.000 g pendant 5 heures 30. La fraction 1 correspond au fond du tube. La radioactivité ^{131}I de chaque fraction est exprimée en % de la radioactivité totale déposée sur le gradient. On observe les pics correspondant aux protéines 27 S, 19 S et 3-8 S.

Figure 8 b.- Profil de sédimentation des iodoprotéines extraites d'un goitre exceptionnel, avec troubles de l'hormonogénèse (goitre D. du tableau I). Ce malade a reçu 500 μCi de ^{131}I 24 heures avant l'opération.

L'ultracentrifugation en gradient de saccharose (5-20 %) a été effectuée dans les mêmes conditions que dans la figure 8 a. On note l'absence de Tg (19 S) ; on n'observe qu'un seul pic correspondant aux protéines légères 3-8 S.

Dans ce cas, malgré l'absence de Tg, les hormones T4 et T3 sont présentes, comme le montre la composition en acides aminés iodés, rapportée dans le Tableau I.

le tissu thyroïdien.

Le second goitre qui présentait une courbe de solubilité très anormale n'a malheureusement pas pu être étudié par ultracentrifugation, de même que les thyroïdes de chiens traités au PTU. En effet, ces études ont été poursuivies au début de notre travail, et nous n'avions pas encore mis au point au laboratoire la technique d'ultracentrifugation. Néanmoins, les résultats obtenus par la méthode d'ultracentrifugation en gradient de saccharose concordent avec ceux obtenus par le relargage : A part quelques exceptions très rares, les tissus thyroïdiens où la synthèse hormonale est déficiente ne présentent pas de modifications importantes dans la répartition des iodoprotéines thyroïdiennes marquées.

b) Teneurs en Tg et en fractions légères 3-8 S, et taux d'iodation de ces protéines.

Pour déterminer la teneur en Tg et en fractions légères 3-8 S, nous avons mesuré la concentration en protéines des extraits thyroïdiens (protéines solubles), et avons étudié la répartition, en densité optique, des protéines thyroïdiennes stables, après ultracentrifugation en gradient de saccharose (5-20 %).

Dans les tissus thyroïdiens humains normaux, la Tg stable représente 50 à 70 % des protéines solubles. La proportion de fractions légères (3-8 S) stables est de 20 à 30 %, alors que celle des fractions légères (3-8 S) marquées à ^{131}I n'est que de 5 % environ. Le tableau III montre les teneurs en Tg et en fractions légères dans différents tissus thyroïdiens. Dans les tissus pathologiques étudiés, la teneur en Tg est inférieure (de moitié environ) à celle des fragments "normaux". Dans le cas de goitre exceptionnel où le profil de sédimentation est tout à fait anormal, la teneur en Tg est nulle.

Au contraire, la teneur en fractions légères 3-8 S est supérieure à la normale dans certains tissus pathologiques ; elle peut atteindre des valeurs doubles de la normale (Tableau III).

TABLEAU III

Tissus étudiés	Concentration mg protéines/g tissu		Taux d'iodation µg ^{127}I /100 µg protéines	
	19 S	3-8 S	19 S	3-8 S
Tissu "normal"	160	65	0,13	0,015
Goître simple	140	60	0,04	0,008
Adénome	85	60	0,02	0,004
Hyperthyroïdies traités par antithyroïdiens	70	120	0,07	0,004
	70	170	0,03	0,005
	40	110	0,03	0,006
Cancers thyroïdiens	60	160	0,08	0,006
	70	140	0,02	0,004
Goître D.	0	135	0	0,018

Teneur en thyroglobuline (19 S) et en fractions légères (3-8 S), et taux d'iodation de ces protéines, dans divers tissus thyroïdiens humains.
Les fractions 19 S et 3-8 S ont été isolées par ultracentrifugation en gradient de saccharose, et la concentration en protéines et en iode stable (^{127}I) a été mesurée dans ces fractions.

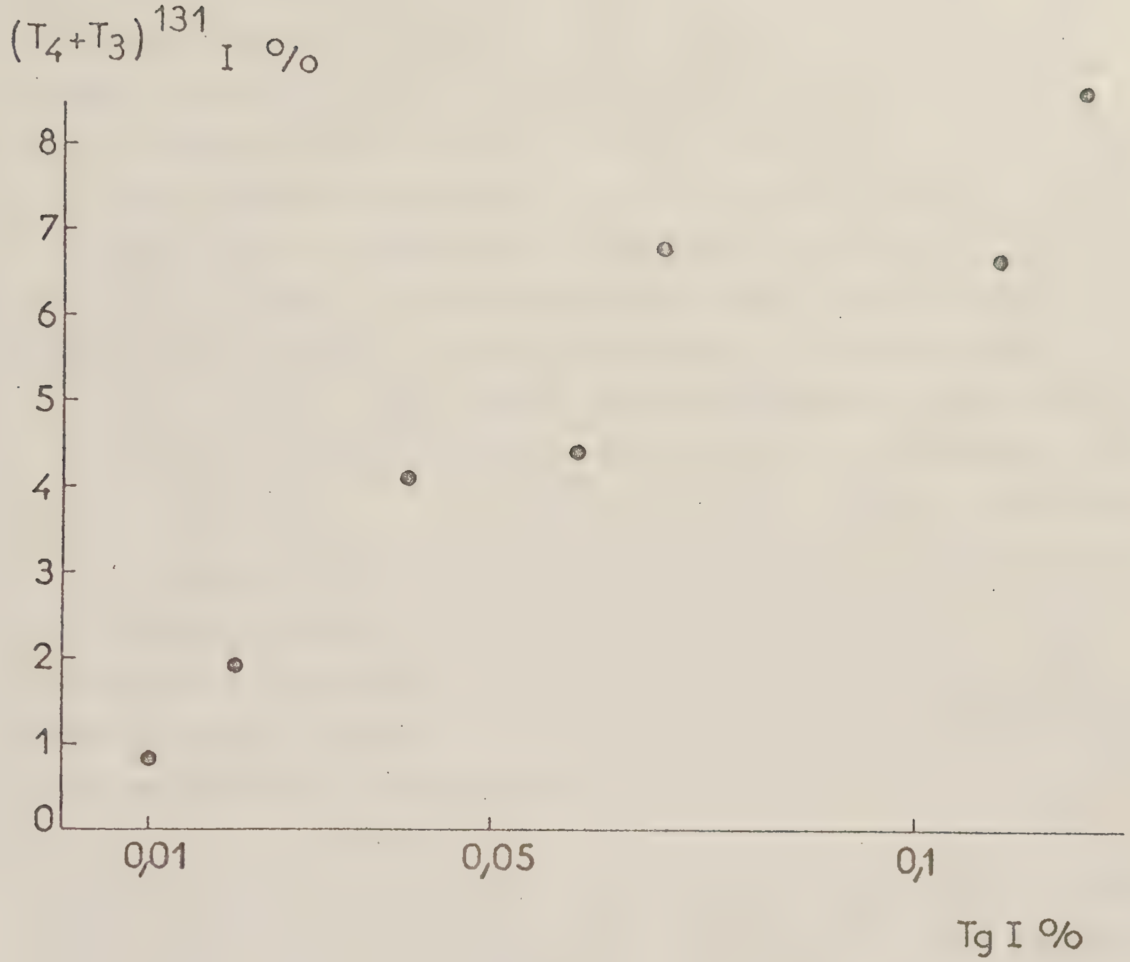


Figure 9 - Relation entre le taux d'iodation de la thyroglobuline et la proportion d'hormones T_4 et T_3, dans divers tissus thyroïdiens "normaux" ou pathologiques.

Le pourcentage de $(T_4 + T_3)$ marquées à ^{131}I (24ème heure) dans le tissu thyroïdien a été déterminé par chromatographie sur papier. La thyroglobuline (19 S) a été isolée par ultracentrifugation en gradient de saccharose, et la concentration en protéine et en iode stable a été mesurée. Le taux d'iodation de la thyroglobuline (Tg I %) est exprimé en µg de ^{127}I pour 100 µg de protéines.

Nous avons également dosé la concentration en iode stable (^{127}I) de la Tg et des fractions légères 3-8 S, exprimée en μg de ^{127}I pour 100 μg de protéines (tableau III). Dans les tissus "normaux", nous avons trouvé un taux d'iodation de la Tg de l'ordre de 0,1 %, soit environ 5 atomes de ^{127}I par molécule de Tg (PM : 650.000). Ce taux, légèrement plus faible que celui trouvé par d'autres auteurs (0,2 à 0,3 %), s'explique par le fait qu'il s'agit d'un tissu péri-nodulaire et non d'un tissu parfaitement normal. Dans les tissus pathologiques étudiés, le taux d'iodation de la Tg est toujours inférieur à celui obtenu dans les fragments "normaux". Ce taux varie de 0,01 à 0,08 % (tableau III). Ainsi, dans les tissus pathologiques, le taux d'iodation de la Tg peut être 10 fois plus faible que celui des tissus "normaux", alors que la teneur en Tg n'est inférieure que de 2 fois environ. Le taux d'iodation des protéines légères 3-8 S est plus faible que celui de la Tg (environ 10 fois plus faible), dans les tissus normaux comme dans les tissus pathologiques (tableau III). Cependant, dans le cas de goitre où la Tg est absente, le taux d'iodation des fractions légères est élevé (0,018 %).

Nous avons recherché s'il existe une relation entre le taux d'iodation de la Tg et la proportion d'hormones dans le tissu thyroïdien. La figure 9 montre les proportions d'hormones T_4 et T_3 marquées à ^{131}I dans différents tissus thyroïdiens, en fonction du taux d'iodation de la Tg. Dans un tissu thyroïdien, la proportion d'hormones est d'autant plus forte que le taux d'iodation de la Tg est plus élevé (Fig. 9).

II - ETUDES EN CULTURE ORGANOTYPIQUE.

Dans certains tissus pathologiques, en particulier dans les tissus cancéreux, qui fixent très peu l'iode radioactif, la radioactivité ^{131}I était très faible. Il était dans ces cas difficile d'interpréter les profils de sédimentation des iodoprotéines marquées à ^{131}I in vivo.

Nous avons donc utilisé la culture organotypique qui permet de marquer les tissus thyroïdiens avec des concentrations assez élevées d'iode radioactif (^{125}I). Nous avons étudié par cette méthode la nature des iodoprotéines thyroïdiennes solubles, iodées ou synthétisées in

vitro, ainsi que l'action de la TSH sur ces iodoprotéines.

1° - Incorporation de l'iode radioactif (^{125}I) en culture dans les iodoprotéines solubles :

Nous avons étudié les iodoprotéines solubles extraites de fragments thyroïdiens normaux ou pathologiques, maintenus en culture. Les fragments ont été cultivés pendant 2 à 5 jours, et ^{125}I a été ajouté au milieu 2 heures ou 24 heures avant la fin de la culture. L'incorporation de ^{125}I dans les iodoprotéines a été étudiée par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Nous avons comparé la répartition du radioiode in vivo et en culture. La figure 10 montre le profil de sédimentation des iodoprotéines extraites d'un tissu thyroïdien humain "normal", marqué à ^{131}I in vivo (24 heures après le marquage) et à ^{125}I en culture (2 heures de marquage), après 3 jours de culture. La thyroglobuline marquée à ^{131}I in vivo est maintenue en culture. On n'observe pas d'augmentation de la proportion des fractions légères marquées à ^{131}I. La Tg ne subit donc pas de dégradation pendant la durée de nos cultures. La distribution de l'iode radioactif introduit dans le milieu de culture (^{125}I) est similaire à celle de l'iode administré in vivo (^{131}I). On note cependant que les fractions légères 3-8 S sont relativement plus marquées en culture (15 %) qu'in vivo (5 %).

La durée de la culture ne semble pas avoir d'influence sur l'incorporation de ^{125}I : nous n'avons pas observé de différences entre les tissus cultivés pendant 1 jour seulement et ceux maintenus en culture pendant un temps plus long (4 ou 5 jours).

Le taux d'incorporation de ^{125}I dans les iodoprotéines solubles augmente entre 2 h et 24 heures de marquage ; mais la répartition de ^{125}I dans les différentes fractions n'est pratiquement pas modifiée.

Nous avons étudié l'incorporation de ^{125}I en culture dans 21 tissus pathologiques différents. Dans les adénomes et les goitres simples (affections bénignes), les profils de sédimentation en ^{125}I

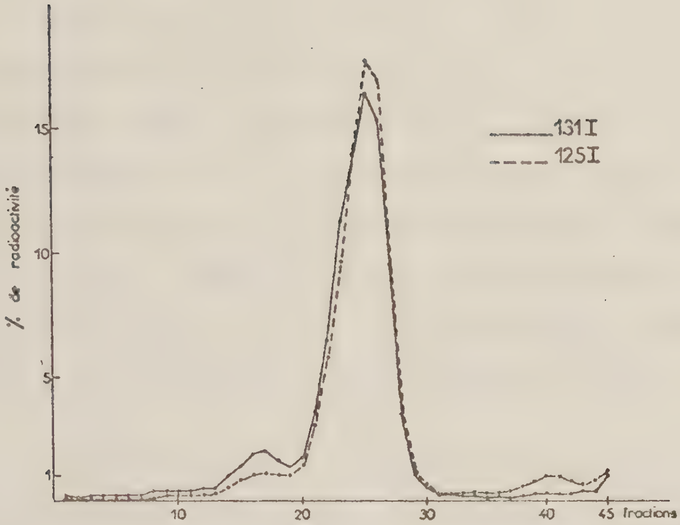


Figure 10 - Profil de sédimentation des iodoprotéines extraites d'un tissu thyroïdien humain "normal", maintenu en culture organotypique.

^{131}I a été administré au patient 24 heures avant l'intervention chirurgicale. Les fragments thyroïdiens ont été maintenus en culture pendant 3 jours ; ^{125}I a été ajouté au milieu 2 heures avant la fin de la culture.

L'extrait thyroïdien a été dialysé contre le tampon Tris-HCl (pH 7,4), et soumis à une ultracentrifugation en gradient de saccharose 5-20 % (rotor SW 65, 125.000g pendant 5 heures 30).

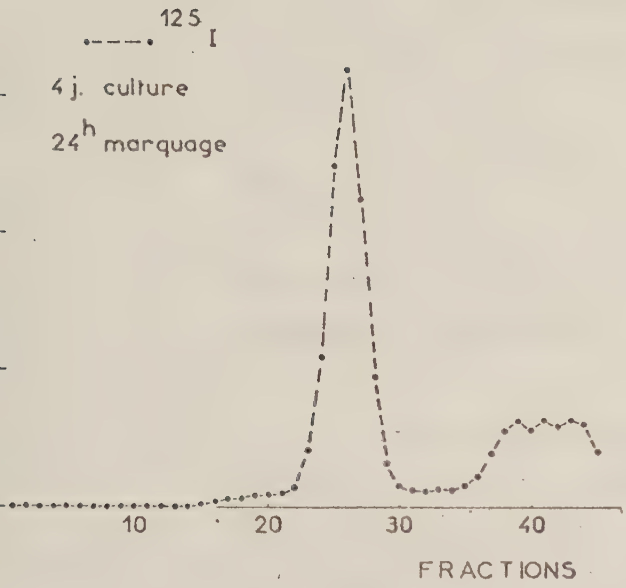
sont semblables à ceux des tissus normaux. Dans les cancers thyroïdiens, la radioactivité ^{125}I des tissus thyroïdiens était très faible ; dans 4 cas, sur les 12 cas de cancers étudiés, le radioiode fixé par le tissu était trop faible, même en culture, pour que l'on puisse faire l'analyse des iodoprotéines solubles par ultracentrifugation. Dans les autres tissus cancéreux, nous avons observé soit un profil de sédimentation en ^{125}I approximativement normal (dans 5 cas), soit une répartition de ^{125}I différente de celle des tissus "normaux" (dans 3 cas) ; dans ces 3 cas, le pourcentage de Tg marquée à ^{125}I était très faible (10 à 15 % des protéines solubles marquées, au lieu de 70 à 75 % dans les tissus "normaux"). (Fig. 11).

Mais, quelle que soit l'allure du profil de sédimentation, le taux d'incorporation de ^{125}I dans les protéines solubles après 24 heures de marquage est très inférieur à celui des fragments normaux (de l'ordre de 0,02 % de la dose ajoutée au milieu, incorporé par 10 mg de tissu, au lieu de 0,1 à 1 % dans les tissus "normaux"). La radioactivité ^{125}I incorporée dans la Tg est donc extrêmement faible (environ 100 fois inférieure à la normale).

Ainsi, dans les tissus cancéreux étudiés, la Tg est présente, mais elle est très faiblement marquée à ^{125}I en culture. La synthèse hormonale s'effectue cependant, puisque nous avons noté en culture la présence d'hormones T_4 et T_3 (tableau II), mais ces hormones sont très faiblement marquées à ^{125}I en culture.

2° - Action de la TSH :

Nous avons étudié l'effet de la TSH sur les iodoprotéines solubles thyroïdiennes. Nous avons recherché si la TSH pouvait stimuler l'incorporation du radioiode dans les iodoprotéines solubles, en particulier dans les tissus où le métabolisme de l'iode est très déficient. En effet, nous avons observé (NATAF et coll.), que la TSH à faible dose (0,5 mU/ml) peut avoir dans certains cas une action stimulante sur le métabolisme de l'iode, alors qu'à forte concentration (50 mU/ml) elle semble diminuer la fixation du radioiode. Nous avons recherché si on pouvait observer un effet semblable sur les iodoprotéines thyroïdiennes solubles.



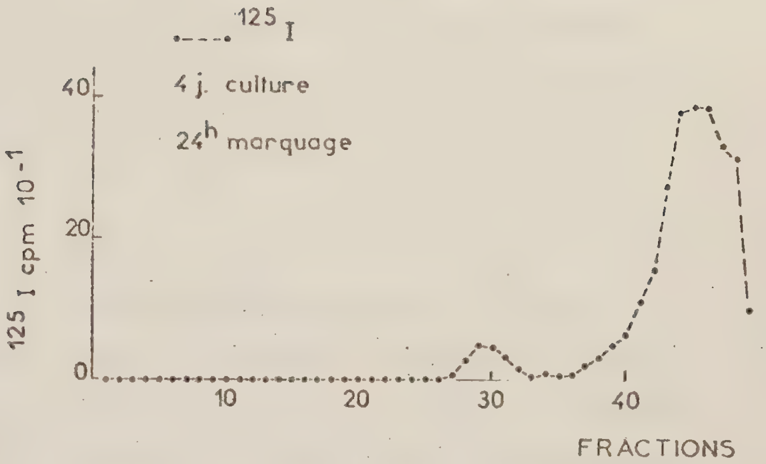


Figure 11a

Figure 11b

Figure 11 - Profil de sédimentation des iodoprotéines extraites de tissus thyroïdiens cancéreux.

Dans ces 2 cas de cancers, la fixation de ^{131}I administré in vivo était trop faible pour permettre d'établir les profils de sédimentation en ^{131}I. Le marquage à l'iode radioactif (^{125}I) a été effectué en culture organotypique.

Dans ces 2 cas, la culture a duré 4 jours et ^{125}I a été ajouté au milieu 24 heures avant la fin de la culture. Les extraits thyroïdiens ont été dialysés et soumis à une ultracentrifugation en gradient de saccharose dans les mêmes conditions que dans la figure 10.

Dans 1 cas (11a), le profil de sédimentation est approximativement normal ; dans l'autre cas (11b), le pourcentage de Tg marquée est très faible par rapport à celui des fractions légères 3-8 S marquées.

Des fragments thyroïdiens normaux (2 cas) ou pathologiques (12 cas) ont été maintenus en culture en présence ou en absence de TSH. La TSH a été ajoutée au milieu de culture à 3 concentrations différentes (0,5 - 5 - 50 mU/ml), dès la mise en culture des fragments, et ^{125}I a été ajouté au milieu 24 heures avant la fin de la culture. Nous avons étudié ainsi l'effet de la TSH sur le taux d'incorporation de ^{125}I dans les iodoprotéines solubles et sur sa répartition dans les différentes iodoprotéines séparées par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

En ce qui concerne le taux d'incorporation du ^{125}I, les résultats sont très variables selon les fragments. Cependant, la TSH à faible concentration (0,05 mU/ml) provoque dans 50 % des cas étudiés une augmentation de l'incorporation du ^{125}I ; les taux d'incorporation sont de 2 à 10 fois supérieurs à ceux obtenus lorsque le milieu utilisé ne renferme pas de TSH. Au contraire, à forte concentration (50 mU/ml), la TSH provoque une diminution de l'incorporation du ^{125}I.

Dans les autres cas étudiés, la TSH est sans action, ou bien elle a un effet inhibiteur ou stimulant aux trois concentrations.

En ce qui concerne la répartition de ^{125}I dans les différentes protéines séparées par ultracentrifugation en gradient de saccharose, les profils de sédimentation restent pratiquement inchangés, même dans les cas où la TSH a un effet stimulant (Fig.12). Nous n'avons observé dans aucun cas des modifications importantes dans la répartition des iodoprotéines solubles.

Ainsi, dans les cas de cancers thyroïdiens où la proportion de Tg est très faible et celle des fractions légères très élevée, la TSH ne modifie pas la répartition de ces fragments. Dans un cas particulier de cancer, l'incorporation du radioiode en culture était extrêmement faible. La TSH, en provoquant l'augmentation de l'incorporation du ^{125}I, a permis d'établir le profil de sédimentation en ^{125}I, qui se trouve être approximativement normal.

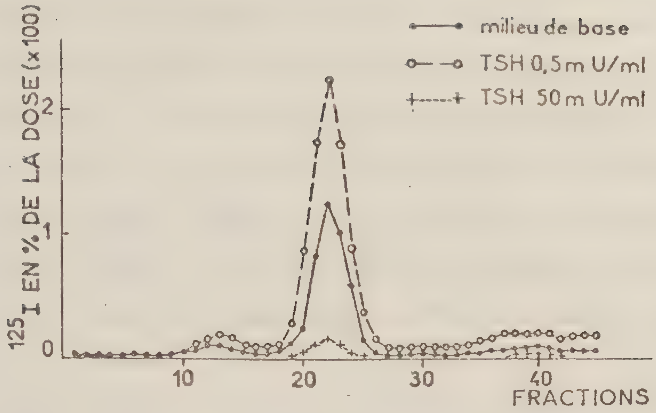


Figure 12 - Effet de la TSH sur les iodoprotéines solubles.

Des fragments thyroïdiens "normaux" ont été maintenus en culture organotypique, soit dans le milieu de base, soit dans du milieu contenant de la TSH (0,5 mU/ml ou 50 mU/ml). La culture a duré 4 jours et ^{125}I a été ajouté au milieu 24 heures avant la fin de la culture. L'ultracentrifugation en gradient de saccharose a été effectuée dans les mêmes conditions que dans la figure 10.

La répartition du ^{125}I dans les différentes fractions est la même en absence ou en présence de TSH. Mais le taux d'incorporation du ^{125}I dans les iodoprotéines solubles (en % de la dose de ^{125}I ajoutée au milieu) varie suivant la concentration de TSH :

Milieu de base sans TSH		: 0,06 %
"	+ TSH 0,5 mU/ml	: 0,12 %
"	+ TSH 50 mU/ml	: 0,01 %

Sur les courbes, la radioactivité de chaque fraction est exprimée en % de la dose de ^{125}I ajouté au milieu, multiplié par 100.

3°) - <u>Biosynthèse des iodoprotéines thyroïdiennes</u> :

Des travaux antérieurs ont montré que, au cours d'incubations de courte durée de coupes de thyroïdes de mouton ou de rat, les acides aminés marqués au ^{14}C sont incorporés d'abord dans les fractions 3-8 S et 12 S, puis dans la thyroglobuline (SEED et GOLDBERG, 1963 ; LISSITZKY et coll. 1964, 1965 ; NUNEZ et coll. 1965). Nous nous sommes proposés d'étudier chez l'Homme la biosynthèse des iodoprotéines thyroïdiennes, au cours de cultures organotypiques d'assez longue durée.

Pour cela, nous avons étudié l'incorporation d'acides aminés marqués au ^{14}C dans les tissus thyroïdiens normaux ou pathologiques, maintenus en culture. Un hydrolysat de protéines d'algues marquées au ^{14}C a été ajouté au milieu de culture à des temps différents : 2 h, 5 h ou 24 heures avant la fin de la culture. Nous avons étudié la répartition du ^{14}C dans les différentes espèces protéiques séparées par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

a) <u>Tissu normal</u> :

La figure 13 montre que le tissu thyroïdien humain "normal" incorpore en culture les acides aminés marqués au ^{14}C dans des protéines de coefficient de sédimentation 27 S, 17-19 S et 3-8 S. Nous n'avons pas trouvé de sous-unité 12 S marquée au ^{14}C dans le tissu thyroïdien humain, contrairement à ce qui a été signalé dans le tissu thyroïdien de mouton et de rat en incubation de courte durée, et à ce que nous avons nous-mêmes observé en culture dans le tissu thyroïdien de foetus de rat (figure 14).

Dans le tissu thyroïdien humain "normal", après 2 heures de marquage au ^{14}C, 70 % de la radioactivité de l'extrait se situe au niveau de la Tg (figure 13). Après un temps de marquage plus long, on observe que la répartition du ^{14}C dans les différentes fractions est différente : après 5 heures de marquage, le pourcentage de la radioactivité de la fraction 3-8 S est plus élevé qu'après 2 heures de marquage, alors que le pourcentage de Tg marquée est plus faible. Après 24 heures de marquage, ce phénomène s'accentue (figure 13).

Pendant cet intervalle de temps, le taux d'incorporation du

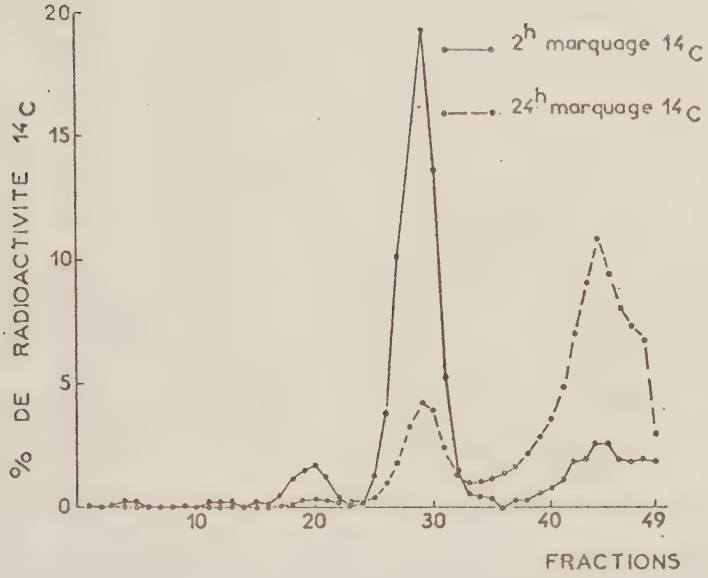


Figure 13 - Profil de sédimentation des iodoprotéines extraites d'un tissu thyroïdien humain "normal", marqué au ^{14}C en culture.

Les fragments thyroïdiens ont été maintenus en culture pendant 2 jours. Un mélange d'acides aminés marqués au ^{14}C (hydrolysat de protéines d'algues) a été ajouté au milieu ; une partie des fragments a été prélevée après 2 heures de marquage, les autres fragments après 24 heures de marquage. Les extraits thyroïdiens ont été dialysés contre le tampon Tris-HCl (pH 7,4), et l'ultracentrifugation en gradient de saccharose (5-20 %) a été effectuée dans les mêmes conditions que dans la figure 10.

Les acides aminés sont incorporés dans les fractions 3-8 S, 17-19 S et 27 S. On note l'absence de 12 S marquée.

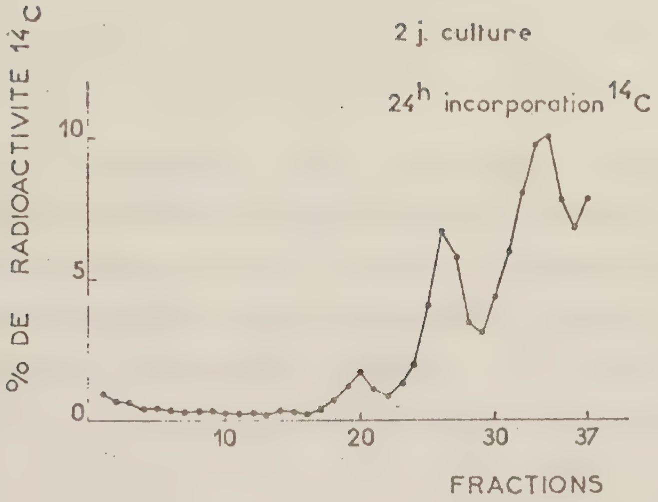


Figure 14 - Profil de sédimentation des iodoprotéines extraites de lobes thyroïdiens de foetus de rat, marqués au ^{14}C en culture.

La culture a duré 2 jours. L'hydrolysat de protéines marquées au ^{14}C a été ajouté au milieu 24 heures avant la fin de la culture.

Les acides aminés sont incorporés dans les fractions 3-8 S, 12 S et 17-19 S.

^{14}C augmente : après 2 heures de marquage, l'incorporation par 10 mg de tissu est de 0,05 % environ de la dose ajoutée au milieu de culture ; elle s'élève à 0,1 % environ après 5 heures de marquage et 0,5 % après 24 heures. En tenant compte de cette augmentation du ^{14}C incorporé entre 2 h et 24 h de marquage, la radioactivité (en pourcentage de la dose multiplié par 100) augmente dans la Tg (de 4 à 8 %) et dans la 27 S (0,4 à 1 %), mais l'augmentation de la radioactivité incorporée dans la fraction 3-8 S est relativement beaucoup plus importante (1 à 30 %).

On pouvait alors penser que ces fractions légères 3-8 S pourraient provenir d'une dissociation de la Tg synthétisée en culture. Nous avons donc fait des expériences de marquages et de chasses (Fig. 15) : Après deux jours de culture, on ajoute au milieu les acides aminés marqués au ^{14}C ; deux heures après, on prélève une partie des fragments que l'on analyse ; les autres sont retirés du milieu radioactif, lavés et remis en culture dans un même milieu dépourvu de radioactivité, et la culture est prolongée de trois jours. On constate que la Tg synthétisée en culture n'a pas subi de dégradation. Au contraire, la synthèse des protéines solubles a légèrement progréssé pendant la période supplémentaire de culture dans le milieu non radioactif : la radioactivité de la fraction 27 S (exprimée en % de la dose ajoutée au milieu multiplié par 100) passe de 0,3 à 1,4 %, celle de la Tg de 11,5 à 17,5 %. Mais la radioactivité ^{14}C de la fraction 3-8 S n'a pratiquement pas changé pendant la chasse (de 4 à 3,7 %).

Des expériences du même ordre (marquage et chasse) réalisées avec ^{125}I montrent en outre que la radioactivité ^{125}I de la fraction 3-8 S n'est pas augmentée après la chasse, et que la Tg marquée à ^{125}I en culture ne subit pas de dégradation.

Les fractions légères 3-8 S synthétisées et iodées en culture ne sont donc pas des produits de dissociation de la Tg.

b) <u>Tissus pathologiques.</u>

Nous avons étudié la biosynthèse des iodoprotéines solubles dans divers tissus thyroïdiens pathologiques (Tableau IV).

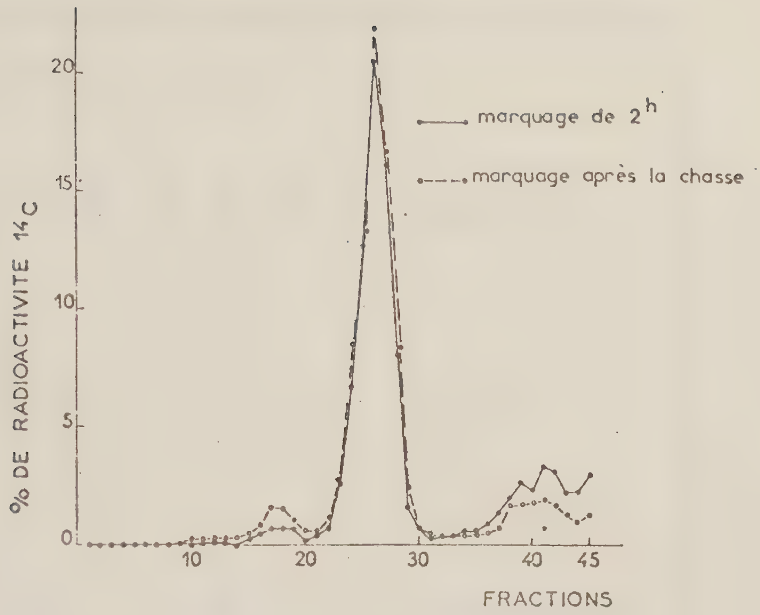


Figure 15 - Expérience de marquage et de chasse.

Des fragments thyroïdiens humains "normaux" ont été maintenus en culture pendant 2 jours. L'hydrolysat de protéines marquées au ^{14}C est alors ajouté au milieu. Après 2 heures de marquage, on prélève une partie des fragments que l'on analyse ; les autres fragments sont retirés du milieu radioactif, lavés et remis en culture dans un même milieu dépourvu de radioactivité, et la culture est prolongée de 3 jours.

La courbe en traits pleins montre le profil de sédimentation des iodoprotéines après 2 heures de marquage au ^{14}C. Après 3 jours supplémentaires de culture dans le milieu dépourvu de radioactivité (courbe en pointillé), le pourcentage de radioactivité des fractions légères 3-8 S n'est pas augmenté : les fractions légères 3-8 S synthétisées en culture ne sont pas des produits de dégradation de la Tg.

TABLEAU IV

Tissus étudiés	Incorporation ^{14}C par 10 mg de tissu après 24 heures de marquage		
	Protéines solubles	19 S	3 - 8 S
	en % de la dose	en % de la dose x 100	
Tissus "normaux"	0,45	8,5	33
	0,34	7	24,5
Adénomes	0,30	6	23
	0,23	5,5	16
Goître simple	0,23	6	15,5
Goître D.	0,98	0	98
Cancers thyroïdiens	0,21	1	19,5
	0,21	0,5	19
	0,17	0,5	15,5
	0,14	0,4	13
	0,11	0,3	10

Biosynthèse de la thyroglobuline (19 S) et des protéines légères (3-8 S) dans divers tissus thyroïdiens humains, maintenus en culture organotypique.
Un mélande d'acides aminés marqués au ^{14}C a été ajouté au milieu 24 heures avant la fin de la culture. L'incorporation du ^{14}C dans les protéines solubles est exprimée en % de la dose ajoutée au milieu, par 10 mg de tissu. La répartition de ^{14}C dans la 19 S et les fractions légères (3-8 S) a été déterminée par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Dans les adénomes et les goitres simples (affections bénignes), le taux d'incorporation des acides aminés marqués au ^{14}C, ainsi que la répartition du ^{14}C dans les différentes protéines séparées par ultracentrifugation, sont voisins de ceux obtenus dans les tissus "normaux".

Dans le cas de goitre exceptionnel où la Tg est absente, le taux d'incorporation des acides aminés marqués au ^{14}C est élevé, mais ce tissu n'incorpore les acides aminés que dans les protéines légères 3-8 S (Figure 16).

Dans les cancers thyroïdiens que nous avons étudiés, la répartition du ^{14}C est différente de celle des tissus "normaux" : Après 2 heures de marquage, les acides aminés marqués au ^{14}C ne sont incoporés que dans les fractions légères 3-8 S. Après 24 heures de marquage, la Tg ne représente qu'un très faible pourcentage des protéines solubles marquées au ^{14}C (fig. 17) ; la proportion des fractions légères 3-8 S est au contraire très élevée (de l'ordre de 90 %). Dans ces tissus cancéreux, le taux d'incorporation du ^{14}C après 24 heures de marquage est inférieur à celui des tissus normaux (environ 2 fois plus faible) (tableau IV). L'incorporation du 14C dans la Tg est donc nettement inférieure à la normale (de l'ordre de 10 fois).

Nous avons montré au paragraphe précédent que, dans les cancers thyroïdiens, l'incorporation du ^{125}I dans la Tg est environ 100 fois plus faible que dans les tissus normaux. Ainsi, dans les tissus cancéreux, la biosynthèse de la Tg est donc diminuée par rapport à la normale, mais l'iodation de celle-ci l'est encore davantage.

III - ETUDES DES FRACTIONS LEGERES 3-8 S .-

Notre étude des iodoprotéines thyroïdiennes a montré que les fractions légères 3-8 S incorporent l'iode radioactif (in vivo et in vitro), ainsi que les acides aminés marqués au ^{14}C, et nos expériences de chasse ont permis de montrer que ces fractions ne sont pas des produits de dissociation de la Tg. Ces protéines légères sont encore mal connues. C'est pourquoi nous

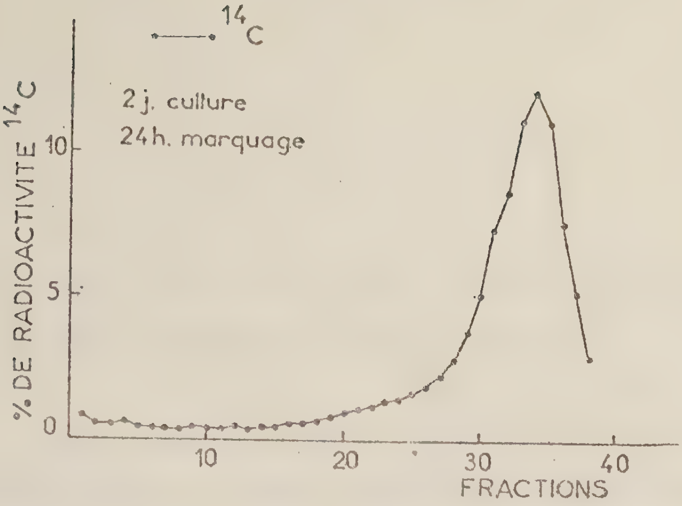


Figure 16 - Profil de sédimentation des iodoprotéines extraites d'un goitre exceptionnel, où la thyroglobuline est absente (goitre D. du tableau I).

La culture a duré 2 jours. L'hydrolysat de protéines marquées au ^{14}C a été ajouté au milieu 24 heures avant la fin de la culture.

On observe un seul pic radioactif de fractions légères 3-8 S marquées au ^{14}C.

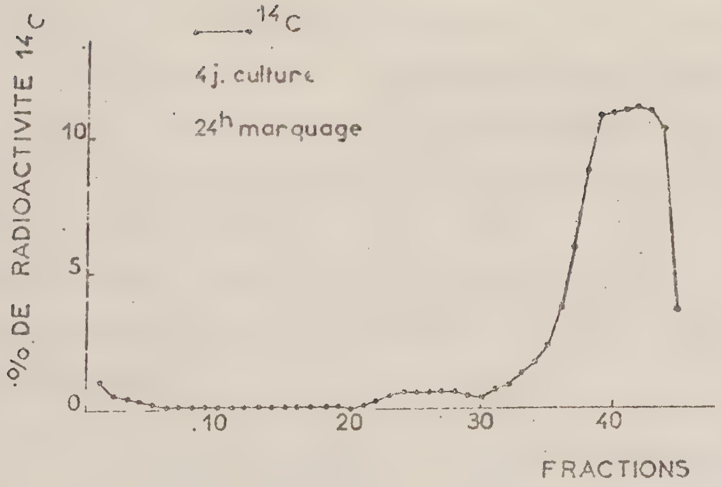


Figure 17 - Profil de sédimentation des iodoprotéines extraites d'un tissu thyroïdien cancéreux, marqué au ^{14}C en culture.

La culture a duré 4 jours. L'hydrolysat de protéines marquées au ^{14}C a été ajouté au milieu 24 heures avant la fin de la culture.

avons entrepris leur étude, afin de chercher à déterminer leur nature et leur rôle physiologique éventuel.

Les protéines légères 3-8 S ont été isolées d'extraits thyroïdiens humains normaux, par ultracentrifugation en gradient de saccharose 5-20 %, puis soumises à des électrophorèses en gel de polyacrylamide, selon la méthode décrite par DAVIS (1964). Cette méthode permet, en effet, de séparer les différentes protéines à la fois suivant leurs charges et leurs poids moléculaires. En outre, nous avons étudié les fractions légères 3-8 S par focalisation isoélectrique sur un support de gel de polyacrylamide, cette méthode permettant de séparer les protéines suivant leurs points isoélectriques. Nous avons utilisé la méthode décrite par WRIGLEY (1968).

1° - Electrophorèse en gel de polyacrylamide :

Les protéines thyroïdiennes solubles extraites d'un tissu thyroïdien humain "normal" et soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (7 %), se séparent en diverses bandes, révélées après coloration des gels au noir amide (figure 18). On observe une bande correspondant à la 27 S, une bande de 19 S, une bande de 12 S dont la présence s'explique par une dissociation de la 19 S au cours de l'électrophorèse qui a lieu en pH alcalin ; on observe en outre 3 bandes qui correspondent à la fraction légère 3-8 S ; ces 3 bandes se retrouvent lorsque la fraction 3-8 S, isolée par ultracentrifugation en gradient de saccharose, est ensuite soumise à une électrophorèse en gel de polyacrylamide.

La bande principale (F1) a la même mobilité électrophorétique que la sérum albumine humaine (monomère) ; les deux autres bandes (F2 et F3) migrent moins rapidement dans le gel.

Les poids moléculaires de ces trois fractions révélées au noir amide ont été déterminés par deux méthodes différentes, basées sur l'existence d'une relation linéaire entre la migration électrophorétique d'une protéine et le logarithme de son poids

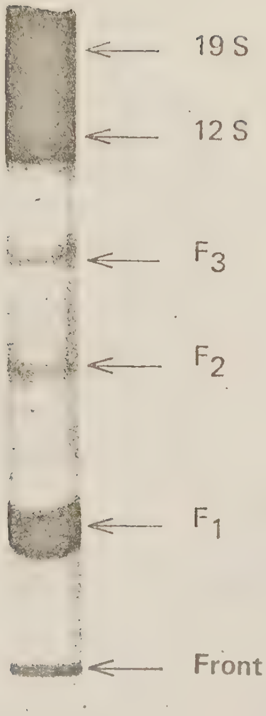


Figure 18 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide (7 %) des iodo-protéines extraites d'un tissu thyroïdien humain "normal".

Après révélation au noir amide, on observe la présence de thyroglobuline (19 S), de 12 S produite par dissociation de la 19 S au cours de l'électrophorèse à pH alcalin, et de 3 bandes F_1, F_2 et F_3 correspondant aux fractions légères (3-8 S). La bande F_1 a la même mobilité électrophorétique que la sérumalbumine humaine (monomère).

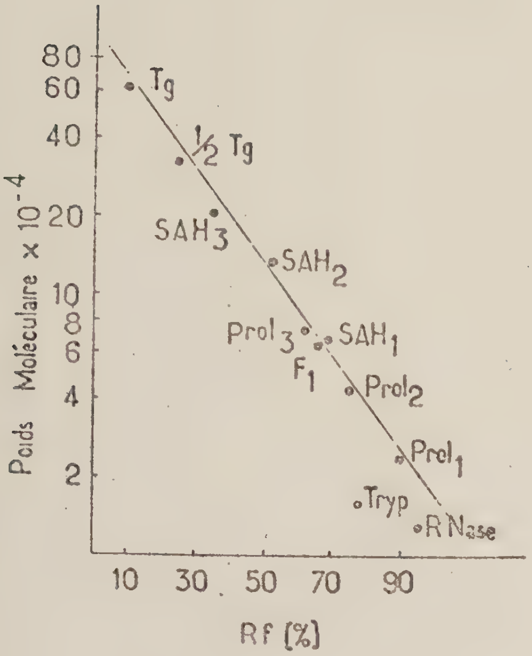


Figure 19a

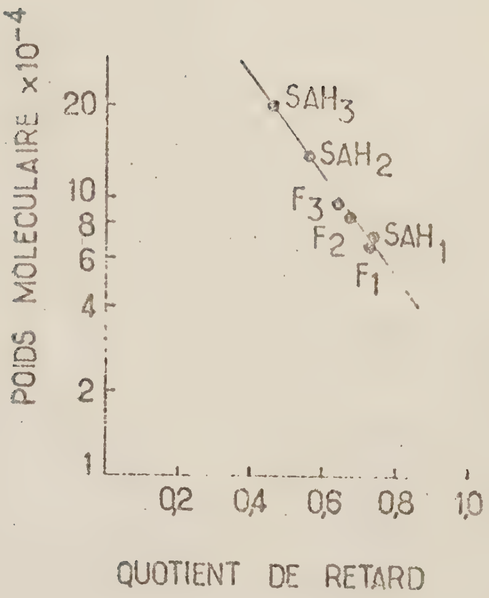


Figure 19b

Figure 19 - Détermination des poids moléculaires des fractions F_1, F_2 et F_3.

Les protéines légères 3-8 S ont été isolées d'extraits thyroîdiens humains "normaux" par ultracentrifugation en gradient de saccharose, puis soumises à des électrophorèses en gel de polyacrylamide. Les poids moléculaires des différentes fractions obtenues ont été estimés grâce à la relation linéaire existant entre la migration électrophorétique d'une protéine et le logarithme de son poids moléculaire. Nous avons utilisé 2 méthodes :

Dans la méthode de Shapiro et coll. (Fig. 19a), la migration est effectuée après traitement au mercaptoéthanol et au dodécylsulfate de sodium (SDS) et en présence de ce dernier.

Dans la méthode de Zwaan (Fig. 19b), on mesure le rapport des mobilités des protéines dans des gels à deux concentrations différentes (7 % et 10 %).

Pour chacune des 2 méthodes, une courbe témoin est établie à l'aide de protéines de poids moléculaires connus : Tg (thyroglobuline 19 S) ; SAH 1, 2, 3 (monomère, dimère et trimère de la sérumalbumine humaine) ; Prol. 1, 2, 3 (monomère, dimère et trimère de la prolactine); Tryp. (trypsine).

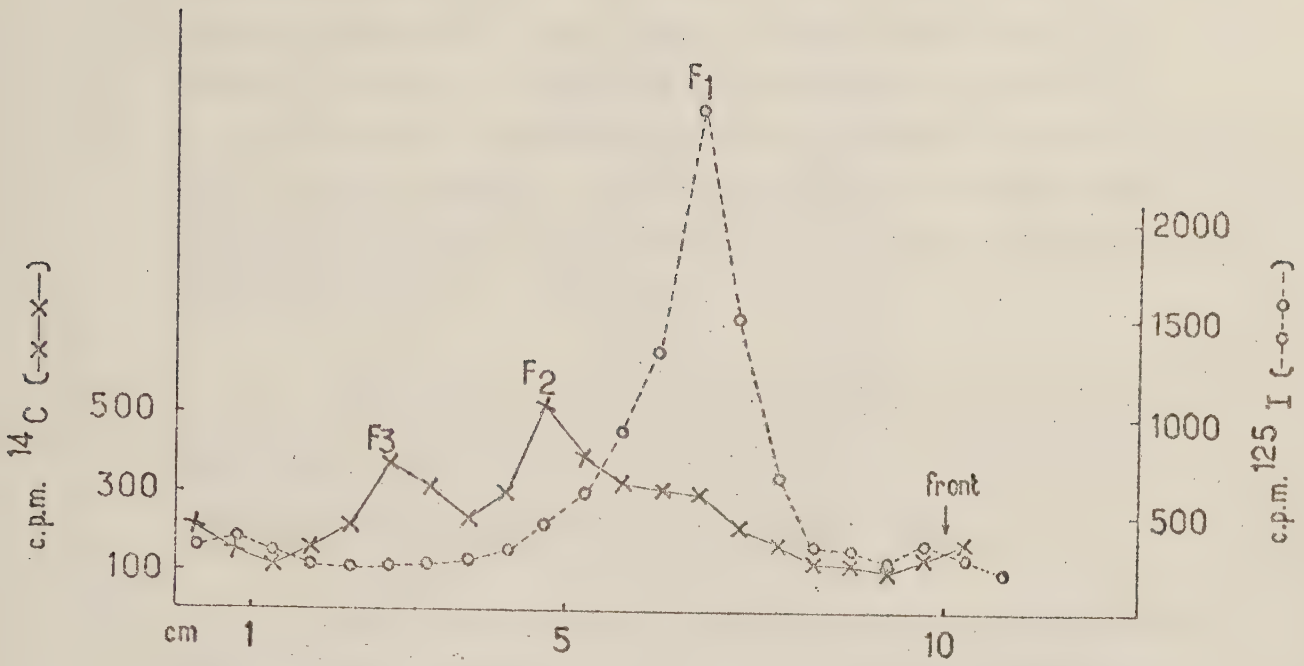


Figure 20 - Répartition de la radioactivité (^{125}I et ^{14}C) des fractions 3-8 S après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 %.

Des fragments thyroïdiens humains "normaux" ont été maintenus en culture et marqués soit par l'iode radioactif (^{125}I), soit par un mélange d'acides aminés marqués au ^{14}C. Les fractions 3-8 S ont été isolées par ultracentrifugation en gradient de saccharose, puis soumises à des électrophorèses. Après la migration, les gels ont été découpés en segments de 0,5 cm et la radioactivité a été mesurée.

moléculaire. Dans une méthode (SHAPIRO et coll. 1967), la migration est effectuée après traitement au mercapto-éthanol et au dodécylsulfate de sodium (SDS) et en présence de ce dernier (figure 19 a). Dans l'autre méthode (ZWAAN, 1967), on mesure le rapport des mobilités des protéines dans deux gels de concentrations différentes (quotient de retard) (figure 19 b). Dans ces deux méthodes, les poids moléculaires des différentes bandes sont déterminés par comparaison avec des protéines de poids moléculaires connus.

Nous avons trouvé ainsi que la bande F1 a un poids moléculaire de 70.000, équivalent à celui de la sérumalbumine humaine (monomère), et que les bandes F2 et F3 ont des poids moléculaires de 85.000 et 95.000 respectivement.

Nous avons étudié la répartition de la radioactivité, sur les gels d'acrylamide, de fractions légères préparées à partir de tissus thyroïdiens marqués soit au radioiode, soit au ^{14}C (figure 20). Lorsque le tissu thyroïdien est marqué au radioiode (in vivo ou en culture), seule la bande F1 est radioactive. Les bandes F2 et F3 ne fixent pas l'iode radioactif. Par contre, lorsque le tissu est marqué au ^{14}C, la radioactivité est répartie en deux pics principaux, correspondant aux bandes F2 et F3.

La fraction albumine, qui incorpore l'iode radioactif, n'est pas synthétisée par le tissu thyroïdien en culture. Au contraire, les deux autres fractions incorporent les acides aminés marqués au ^{14}C, mais ne sont pas iodées. Ces deux fractions, qui sont synthétisées par le tissu thyroïdien en culture et qui ont des poids moléculaires proches de ceux des chaines constitutives de la Tg, pourraient être des précurseurs de la thyroglobuline.

2° - Focalisation isoélectrique :

Par focalisation isoélectrique en présence d'Ampholine du pH 3-10, les protéines de la fraction 3-8 S se trouvent séparées en bandes de précipitation différentes suivant leurs

Figure 21 - Focalisation isoélectrique des protéines thyroïdiennes légères 3-8 S (à droite) et de la sérumalbumine humaine (à gauche).

Les protéines légères 3-8 S ont été isolées d'un extrait thyroïdien humain "normal" par ultracentrifugation en gradient de saccharose, puis soumises à une focalisation isoélectrique sur un support de gel de polyacrylamide à 7 % avec de l'Ampholine pH 3-10. Les protéines sont ainsi séparées en bandes de précipitation différentes suivant leurs points isoélectriques. Ces bandes de précipitation sont révélées par l'acide trichloracétique (5 %).

SAH = sérumalbumine humaine

Hb = hémoglobine.

points isoélectriques (figure 21).

On observe une bande colorée qui précipite à pH 7,1 et paraît correspondre à l'hémoglobine. Les autres fractions précipitent entre pH 4 et pH 5 : une des fractions (F1) précipite au même pH que la sérumalbumine humaine. Les deux autres bandes principales (F2 et F3) ont un point isoélectrique légèrement plus acide que celui de l'albumine, de 4,5 environ, c'est-à-dire proche de celui de la thyroglobuline.

3° - Cas particulier du goitre exceptionnel où la Tg est absente.

Nous avons étudié, par électrophorèse en gel de polyacrylamide, les iodoprotéines solubles extraites du goitre exceptionnel, pour lequel nous avions noté l'absence de thyroglobuline par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

La figure 22 montre l'électrophorèse en gel d'acrylamide (7 %) de l'extrait thyroïdien de ce tissu goitreux : on n'observe aucune trace de thyroglobuline (19 S), ni de 27 S, ni de 12 S. Seules les fractions légères sont présentes, et se répartissent en 3 bandes, comme dans les tissus normaux. La bande principale a la même mobilité électrophorétique que la sérumalbumine humaine.

Des fragments de ce tissu goitreux ont été marqués en culture, d'une part avec ^{125}I, d'autre part avec un mélange d'acides aminés marqués au ^{14}C. Lorsque l'électrophorèse est effectuée avec l'extrait thyroïdien marqué à ^{125}I, seule la bande d'albumine est radioactive. Lorsque l'électrophorèse est effectuée avec l'extrait marqué au ^{14}C, on n'observe pas de pic radioactif au niveau de la bande d'albumine ; comme dans les tissus normaux, la radioactivité ^{14}C est répartie dans le gel au niveau des 2 bandes migrant plus lentement que l'albumine.

Ce tissu goitreux ne synthétise pas la Tg, mais il incorpore en culture les acides aminés marqués au ^{14}C

Figure 22 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide (7 %) de l'extrait thyroïdien d'un goitre exceptionnel (goitre D. du tableau I).

Après révélation au noir amide, on n'observe pas de trace de thyroglobuline (19 S), ni de 12 S. Seules les fractions légères sont présentes et se répartissent en 3 bandes. La bande principale a la même mobilité électrophorétique que la sérumalbumine humaine.

dans des protéines de faibles poids moléculaires, qui sont présentes dans le tissu thyroïdien normal, et qui pourraient être des précurseurs de la Tg. Cependant, ces "précurseurs" ne sont pas marqués au radioiode. La fraction albumine est la seule protéine iodée dans ce goitre. Nous avons noté, au début de ce travail, que les hormones thyroïdiennes sont présentes dans ce tissu goitreux. On peut penser que, en absence de thyroglobuline, ce soit l'iodoalbumine qui synthétise les hormones thyroïdiennes.

D I S C U S S I O N

1) Synthèse hormonale

L'analyse de tissus thyroïdiens humains très variés, en particulier de tissus pathologiques présentant des troubles de l'hormonogénèse, nous a permis d'étudier les relations entre la synthèse hormonale et les caractères des iodoprotéines thyroïdiennes, en particulier la teneur en iode de ces iodoprotéines.

La concentration en iode stable (^{127}I) dans le tissu thyroïdien semble un facteur important dans la synthèse hormonale. En effet, l'étude de tissus thyroïdiens, de concentrations en iode stable très différentes a montré qu'il existe une relation linéaire, d'une part entre la teneur en iode stable d'un tissu thyroïdien et sa capacité de fixation de l'iode radioactif, et d'autre part entre la teneur en iode stable, et la teneur en hormones T_4 et T_3 marquées à ^{131}I (à la 24ème heure après le marquage). Les glandes pauvres en iode (^{127}I) synthétisent donc, en 24 heures, moins d'hormones que celles dont la concentration en ^{127}I est plus élevée. D'autres auteurs avaient signalé que, dans la plupart des glandes pathologiques, la concentration en iode stable (^{127}I) est faible, le taux de fixation de l'iode radioactif est bas, et la teneur en hormones T_4 et T_3 marqués à ^{131}I est inférieure à celle des glandes normales (TRIANTAPHYLLIDIS et TUBIANA 1956, PITT-RIVERS et coll. 1957, ERMANS et coll. 1961, BECKERS et de VISSCHER 1963).

Nous avons cherché à suivre l'évolution dans le temps de la teneur en hormones thyroïdiennes marquées, au moyen de doubles marquages à ^{131}I et ^{125}I in vivo, ^{131}I étant administre 24 h avant l'opération, et ^{125}I plusieurs jours avant l'intervention. Cette étude cinétique a montré que dans les tissus thyroïdiens

normaux, la teneur en hormones marquées augmente avec le temps. Il en est de même dans les tissus pathologiques étudiés, où la teneur en hormones, bien que faible à la 24ème heure après le marquage, augmente cependant avec le temps (THOMAS et coll. 1966 et 1967). D'autres auteurs ont étudié également la cinétique de la synthèse hormonale ; SALABE et coll. (1965) ont montré que, dans des tissus nodulaires hyperfonctionnels, les iodothyronines étaient présentes 12 heures après l'ingestion du radioiode et que leur teneur était plus élevée au douzième jour. Cependant ROCMANS et coll. (1965) ont trouvé, dans cinq cas de goîtres euthyroïdiens, une proportion d'iodothyronines marquées très faible ($\leqslant$ 1 %) quelle que soit la durée du marquage.

Nos résultats montrent que, dans les glandes pauvres en ^{127}I, le déficit de la teneur en hormones marquées s'atténue avec le temps. Il s'agirait donc, dans les glandes pauvres en iode, d'un ralentissement de la synthèse hormonale. ERMANS et coll. (1965) étudiant des goîtres simples, ont signalé également un ralentissement de la synthèse hormonale, dans ces glandes à faible concentration en iode stable.

Il est intéressant de noter que, dans les cas pathologiques très divers que nous avons étudiés, les troubles de l'hormonogénèse se manifestent de façon à peu près analogue. En effet, dans l'ensemble des cas étudiés (adénomes, hyperthyroïdies traitées par antithyroïdiens et la plupart des goîtres), le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ à la 24ème heure est nettement supérieur à 1 et la teneur en hormones T_4 et T_3 marquées est faible. ETLING et coll. (1969) ont montré également "qu'il n'est pas possible de caractériser une maladie définie de la thyroïde par une anomalie biochimique spécifique".

Deux cas de goîtres sont à signaler tout particulièrement. En effet, l'étude de ces 2 goîtres a été très intéressante pour la compréhension des relations entre l'hormonogénèse et les iodoprotéines thyroïdiennes. Dans ces 2 cas, il s'agissait de goîtres apparus

dès l'enfance et caractérisés par une discordance entre l'hypothyroïdie et l'hyperfixation de l'iode radioactif. L'un de ces goîtres a fait l'objet d'une étude détaillée (TUBIANA et coll. 1968) l'autre cas a été étudié tout récemment. Dans ces 2 goîtres, l'analyse chromatographique du tissu thyroïdien a donné des résultats très voisins. Le métabolisme de l'iode présente plusieurs anomalies par rapport aux autres cas pathologiques : le rapport $\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$ marquées à la 24ème heure est inférieur à 1 ; la proportion d'hormones T_4 et T_3 marquées à ^{131}I est faible, mais non négligeable (5 % environ) ; dans l'un de ces 2 cas, pour lequel nous avons fait une étude par double marquage, la teneur en hormones marquées n'augmente pratiquement pas dans le temps (entre le 1er et le 7ème jour après le marquage). Dans ces 2 goîtres, la teneur en iodothyronines marquées est donc faible, malgré un rapport $\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$ bas ; ceci semble indiquer un blocage de la synthèse hormonale au stade DIT. Il faut remarquer qu'un rapport $\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$ inférieur à 1 a déjà été observé dans des goîtres avec iodoprotéines anormales (LISSITZKY et coll. 1967). De plus, dans nos 2 goîtres, une proportion élevée (20 % environ) d'iodoprotéines ou de petits peptides résistait à l'hydrolyse par la pronase et restait à l'origine des chromatogrammes. Ce fait, qui a été signalé dans quelques cas de goîtres (LISSITZKY et coll. 1967) semblerait indiquer que l'iodation survient sur des sites situés profondément dans la protéine, ou au niveau de molécules non hydrolysables par la pronase. Dans nos deux cas de goîtres, l'étude des iodoprotéines a donné des résultats tout à fait différents de ceux des autres cas pathologiques, nous en discuterons au paragraphe suivant.

En ce qui concerne les fragments de cancers de la thyroïde, leur teneur en iode et leur taux de fixation de ^{131}I administré in vivo sont extrêmement bas. De ce fait, il est difficile d'obtenir des renseignements sur leur métabolisme de l'iode in vivo. Mais, grâce au marquage en culture organotypique, nous avons pu étudier l'incorporation de l'iode radioactif (^{125}I) dans ces tissus (NATAF et coll. 1969). Dans quelques tissus cancéreux, l'iode radioactif

ajouté en culture reste sous forme d'iodures ou, en très faible proportion, sous forme de MIT. Mais, dans la plupart des cas, les hormones T_4 et T_3 sont présents, dans les cancers thyroïdiens, bien que très faiblement marquées en radioiode.

2) Caractères de la thyroglobuline

Les hormones thyroïdiennes se formant au sein même des molécules de thyroglobuline, on pouvait penser que les troubles de la synthèse hormonale observés dans les glandes pathologiques pourraient être liés à des anomalies de cette protéine. Nous avons donc étudié, dans divers tissus pathologiques, les iodoprotéines thyroïdiennes, et plus particulièrement la thyroglobuline. Nous avons recherché si on pouvait mettre en évidence, dans les tissus pathologiques, des modifications de cette protéine ; modifications dans ses caractères de solubilité et de sédimentation, dans son taux d'iodation, ou dans sa teneur dans le tissu thyroïdien.

Dans la plupart des tissus pathologiques étudiés, les caractères de solubilité et les profils de sédimentation des iodoprotéines thyroïdiennes sont normaux. Nos résultats se rapprochent de ceux de De CROMBRUGGHE (1968) d'une part, qui ne trouve qu'une très faible différence entre les constantes de sédimentation des thyroglobulines humaines normales et celles des thyroglobulines de goîtres (18-19 S pour le tissu goitreux), et des résultats de VALENTA et coll. (1968) d'autre part, qui n'observent pas de différence dans la constante de sédimentation entre les thyroglobulines des tissus normaux et celles provenant de cas pathologiques divers.

Par contre, dans quelques cas, d'ailleurs extrêmement rares, d'autres auteurs ont trouvé à la place de la thyroglobuline 19 S des protéines thyroïdiennes ayant les caractères immunologiques de la Tg, mais des coefficients de sédimentation nettement inférieurs à 19 S (6eme Conférence Internationale sur la Thyroïde, Vienne 1970) ; ROBBINS, dans une tumeur thyroïdienne expérimentale de rat, a décrit

une protéine ayant un coefficient de sédimentation de 6-9 S ; VAN YAARSWELD et coll., dans un goître congénital bovin, ont montré la présence d'une protéine ayant un coefficient de sédimentation de 11,9 et un poids moléculaire de 330.000 ; FALCONER, dans un goître congénital de mouton, a trouvé une protéine de constante de sédimentation 8-9 S ; chez l'Homme, CASSANO et coll. ont isolé de goîtres congénitaux une fraction ayant la même solubilité que la thyroglobuline dans les sels neutres et les caractères immunologiques de la Tg, mais un coefficient de sédimentation de 6 S.

En ce qui concerne la teneur en thyroglobuline dans le tissu thyroïdien et le taux d'iodation de cette protéine, des différences quantitatives entre les tissus normaux et les tissus pathologiques sont observées.

La teneur en iode de la thyroglobuline, dans les tissus pathologiques que nous avons étudiés, est inférieure à celle des tissus normaux. Nos résultats concordent avec ceux de SALABE et coll. (1965), De CROMBRUGGHE (1968), et VALENTA et coll. (1968). Il est intéressant de remarquer que le faible taux d'iodation de la thyroglobuline ne semble pas être accompagné de modifications dans la constante de sédimentation de cette protéine, ainsi que l'avaient déjà signalé VALENTA et coll. (1968). Nous avions noté une relation linéaire entre la teneur en iode stable (^{127}I) d'un tissu thyroïdien et sa teneur en hormones T_4 et T_3. De même, nos résultats montrent que plus la teneur en iode stable (^{127}I) de la thyroglobuline est forte, plus la teneur en hormones est élevée. Ceci semble montrer que les troubles de la synthèse hormonale pourraient être liés à une déficience dans l'iodation de la thyroglobuline. En effet, on peut penser que, dans les tissus thyroïdiens pathologiques où le taux d'iodation de la thyroglobuline est 10 fois inférieur à celui des tissus normaux, le nombre d'atomes de ^{127}I par molécule de Tg est alors insuffisant pour permettre la synthèse de T_3 et T_4. Il faut noter toutefois que les molécules

de Tg sont très hétérogènes dans leur teneur en iode, et que nous avons mesuré en fait le taux d'iodation moyen des molécules de Tg. Cette interprétation semble compatible avec les résultats d'autres auteurs qui ont montré qu'il est possible d'augmenter la proportion de thyroxine (T_4) dans la Tg en iodant in vitro une thyroglobuline faiblement iodée (VALENTA et coll. 1968, LAMAS et coll. 1971).

La teneur en thyroglobuline, dans les tissus pathologiques que nous avons étudiés, est inférieure à celle des tissus normaux. Ce fait a été signalé également par d'autres auteurs : ROBBINS et coll. (1959), de GROOT et CARVALHO (1960), BECKERS et de VISSCHER (1961) dans des goîtres ; ROBBINS et coll. (1959), THIER et coll. (1965) dans des thyroïdites ; ROBBINS et coll. (1959), RALL et coll. (1960), BECKERS et VISSCHER (1960), dans des cancers thyroïdiens. On peut donc penser à un défaut de synthèse de la Tg dans les tissus pathologiques. Toutefois, la diminution de la teneur en Tg dans les tissus pathologiques (de l'ordre de 2 fois plus faible que dans les tissus normaux) est beaucoup moins grande que la diminution du taux d'iodation de la Tg (de l'ordre de 10 fois plus faible que dans les tissus normaux).

Cependant, dans un cas de goître, la thyroglobuline était absente, et nous n'avons observé qu'une seule fraction iodoprotéique, sédimentant plus lentement que la Tg (fraction 3-8 S) Dans ce goître, de même que dans un autre cas de goître tout à fait similaire (TUBIANA et coll. 1968), les courbes de solubilité des iodoprotéines étaient très anormales. Ces 2 goîtres sont très voisins des 5 autres goîtres avec troubles de l'hormonogénèse étudiés précédemment (ROCHE et coll. 1959, MICHEL et coll. 1964), et des 2 cas de goîtres congénitaux décrits par LISSITZKY et coll. (1967 et 1968). Dans ces goîtres, malgré l'absence de thyroglobuline, les hormones thyroïdiennes sont présentes dans le tissu thyroïdien, bien que en faible quantité. Il semble donc que la thyroglobuline ne soit pas indispensable à la synthèse des hormones thyroïdiennes, et que dans certains cas une autre protéine puisse la remplacer. On peut penser, comme LISSITZKY et coll. (1967) que la fraction iodoprotéique légère 3-8 S serait capable de remplacer en partie la Tg pour la synthèse des hormones thyroïdiennes.

3) Iodoprotéines différentes de la thyroglobuline.-

Les iodoprotéines plus solubles que la thyroglobuline et sédimentant plus lentement (fractions légères 3-8 S) ont été signalées en proportion anormalement élevée dans diverses affections thyroïdiennes, notamment dans quelques cas de cancers thyroïdiens (Stanley 1956, Easty et coll. 1958), et dans des adénomes bénins et des goitres congénitaux (ROBBINS et coll. 1959, DE GROOT et coll. 1959 et 1960, BECKERS et DE VISSCHER 1961). ROCHE, MICHEL et TUBIANA (1959) ont observé, dans deux cas de goitres avec hyperfixation de l'iode radioactif et troubles de l'hormonogénèse, une proportion élevée d'iodoprotéines solubles dans les fortes concentrations salines. Ce fait a été retrouvé dans trois autres cas de goitres (MICHEL et Coll. 1964).

Les iodoprotéines thyroïdiennes, marquées à ^{131}I in vivo, plus solubles que la Tg dans le sulfate d'ammonium et sédimentant plus lentement à l'ultracentrifugation (fraction 3-8 S), représentent environ 5 % des iodoprotéines marquées des extraits thyroïdiens normaux. Ce pourcentage reste approximativement le même dans la plupart des tissus pathologiques, puisque parmi le grand nombre de cas que nous avons étudiés, nous n'avons trouvé que quelques rares cas pathologiques où ces iodoprotéines étaient présentes en proportion supérieure à la normale : parmi les 58 cas pathologiques que nous avons étudiés au moyen du relargage, nous n'avons trouvé que 4 cas où la fraction iodoprotéique marquée plus soluble que la Tg était en proportion légèrement augmentée par rapport à la normale (2 thyroïdites de Hashimoto et 2 cancers thyroïdiens), et 2 cas de goitres exceptionnels où les courbes de solubilité étaient tout à fait anormales. Sur les 20 cas pathologiques étudiés par ultracentrifugation en gradient de saccharose, nous n'avons trouvé que 2 cas de thyroïdites de Hashimoto où la fraction légère 3-8 S marquée à ^{131}I in vivo était en proportion légèrement supérieure à la normale, et 1 cas de goitre tout à fait exceptionnel où cette fraction protéique était la seule présente dans l'extrait thyroïdien.

Bien que plusieurs cas aient été rapportés, isolément, par divers auteurs, il semble donc, d'après notre étude systématique, que l'augmentation de la proportion des iodoprotéines marquées plus solubles que la thyroglobuline et sédimentant plus lentement soit un fait assez rare. Rappelons que, dans une étude portant sur 21 sujets goitreux d'une région endémique du Congo, BECKERS et DE VISSCHER (1961) n'avaient observé ce fait que chez un seul patient goitreux qui était atteint de crétinisme.

Outre la proportion, nous avons déterminé, par la mesure en densité optique, la concentration des iodoprotéines légères 3-8 S dans quelques tissus pathologiques. Il semble que la teneur de ces iodoprotéines légères dans le tissu thyroïdien soit élevée dans les cas d'hyperthyroïdies traitées par antithyroïdiens et dans les cas de cancers de la thyroïde. Dans ces cas, la teneur en iodoprotéines légères (3-8 S) des tissus thyroïdiens était environ le double de celle des tissus normaux. Cette teneur était élevée également dans le cas de goitre exceptionnel où la thyroglobuline était absente.

Quelle peut être la cause de l'augmentation de cette fraction iodoprotéique dans certains cas pathologiques ? On peut penser qu'elle serait due à l'intense stimulation thyroïdienne provoquée par l'hypersecrétion de TSH qui se produit dans les cas où la synthèse hormonale est insuffisante. Pour certains auteurs en effet, l'hyperplasie thyroïdienne provoquée par la TSH favoriserait l'élévation de la teneur en iodoprotéines solubles. ROCHE et coll. (1951) ont observé ce fait dans un goitre provoqué expérimentalement chez le chien par administration de propylthiouracile (PTU), et LOBO et coll. (1966) chez des rats traités par la TSH ou par des antithyroïdiens (carbimazole). Cependant, dans les thyroïdes de nos chiens traités au PTU, les courbes de solubilité étaient semblables à celles des chiens témoins, et nous n'avons pas observé d'augmentation de la proportion des iodoprotéines plus solubles que la thyroglobuline (THOMAS et coll. 1967).

4) Biosynthèse de la thyroglobuline.-

La plupart des recherches poursuivies sur la biosynthèse de la thyroglobuline ont été effectuées chez l'animal, au moyen d'incubations de courte durée. SEED et GOLDBERG (1963, 1965) chez le mouton, LISSITZKY et coll. (1964, 1965) et NUNEZ et coll. (1965) chez le rat, ont montré que les acides aminés marqués au ^{14}C sont incorporés d'abord dans les fractions 3-8 S et 12 S, puis dans la Tg. Les mêmes observations ont été faites in vivo chez le rat ou le cobaye, après injection de leucine marquée au ^{14}C ou au tritium (VECCHIO et coll. 1966, CAVALIERI et SEARLE 1967, EKHOLM et STRANDBERG 1967).

Nous avons étudié chez l'Homme la biosynthèse de la thyroglobuline, au moyen de la culture organotypique qui permet de maintenir des fragments thyroïdiens en culture pendant quelques jours (NATAF et coll. 1966, 1969). Nous avons d'abord constaté que la thyroglobuline iodée in vivo est maintenue en culture, et qu'il n'y a pas dissociation de celle-ci en fractions plus légères. Nous avons ensuite étudié l'incorporation en culture d'acides aminés marqués au ^{14}C.

Dans le tissu thyroïdien humain normal, les acides aminés sont incorporés dans les fractions 3-8 S, 17-19 S et 27 S (NATAF et coll. 1970). Nous n'avons pas observé la présence de 12 S marquée au ^{14}C. Par contre, nous avons trouvé la sous-unité 12 S dans les lobes thyroïdiens de foetus de rat maintenus en culture, de même que d'autres auteurs l'ont signalé dans des coupes de tissus thyroïdiens de rat et de mouton en incubation (SEED et GOLDBERG 1963, LISSITZKY et coll. 1964, NUNEZ et coll. 1967). La signification physiologique de la 12 S n'est pas encore parfaitement connue. Plusieurs hypothèses ont été formulées, selon lesquelles la sous-unité 12 S serait soit un précurseur formant la Tg par dimérisation, soit un produit de dissociation de la Tg dans certaines conditions expérimentales (SIMON et coll. 1966). Selon l'une ou l'autre de ces hypothèses, l'absence de 12 S marquée au ^{14}C dans le tissu thyroïdien humain peut s'expliquer soit par le fait que chez l'Homme la biosynthèse de la thyroglo-

buline serait plus rapide que chez le rat et le mouton, soit par le fait que la thyroglobuline humaine serait plus stable.

La biosynthèse de la thyroglobuline dans les fragments thyroïdiens humains normaux semble relativement rapide en culture, puisque après 2 heures de marquage, la majeure partie (70 %) de la radioactivité ^{14}C des protéines solubles se trouve dans la thyroglobuline, et 4 à 7 % dans 27 S qui est le dimère de la 19 S. Dans les fractions légères 3-8 S, l'incorporation des acides aminés ^{14}C est relativement faible après 2 heures de marquage ; mais la radioactivité de ces fractions légères augmente considérablement entre 2 heures et 24 heures d'incorporation. Ceci semble indiquer que les fractions légères 3-8 S pourraient être des produits de dégradation de la Tg, ou bien que ces fractions auraient une vitesse de synthèse plus lente que celle de la Tg.

On pouvait en effet se demander si ces fractions légères ne proviendraient pas d'une dissociation de la thyroglobuline synthétisée en culture. En effet, cette hypothèse a été formulée par certains auteurs (DE GROOT et coll. 1960, TORRESANI et coll. 1968). Cependant, nos expériences de marquage et de chasse ont permis de montrer que, après 2 heures de marquage par les acides aminés ^{14}C, puis chasse de plusieurs jours en prolongeant la culture en milieu non radioactif, la thyroglobuline ne subit pas de dégradation. Les fractions légères 3-8 S synthétisées en culture ne sont donc pas des produits de dissociation de la thyroglobuline.

Dans les fragments d'adénomes et de goitres simples que nous avons étudiés en culture, la biosynthèse des iodoprotéines thyroïdiennes semble très proche de celle des fragments normaux, puisque le taux d'incorporation des acides aminés marqués au ^{14}C et leur répartition dans les différentes fractions sont pratiquement normaux. Par contre, dans les fragments de cancers thyroïdiens, le taux d'incorporation du ^{14}C dans les protéines solubles est inférieur à celui des fragments normaux, et la biosynthèse de thyroglobuline semble très ralentie puisque,

après 2 heures de marquage, on n'observe pratiquement aucune incorporation du ^{14}C au niveau de la Tg. Après 24 heures de marquage, on note un faible pourcentage de la radioactivité de l'extrait dans la Tg. Dans ces fragments cancéreux, la teneur en Tg marquée au ^{14}C est inférieure à celle trouvée dans les fragments normaux(après 24 heures de marquage). Cependant, la diminution de l'incorporation des acides aminés marqués au ^{14}C dans la Tg est moins grande que la diminution de l'incorporation de l'iode radioactif. Il semble donc que, dans ces fragments cancéreux, le défaut d'iodation de la thyroglobuline soit plus net que le défaut de biosynthèse de cette protéine.

Dans le cas de goitre exceptionnel pour lequel la Tg est absente, nous n'avons pas observé d'incorporation du ^{14}C au niveau de la Tg ; cependant, ce tissu goitreux incorpore les acides aminés marqués au ^{14}C, mais la totalité de la radioactivité incorporée dans les protéines solubles est retrouvée au niveau des protéines légères (3-8 S).

5) <u>Nature des fractions légères 3-8 S</u>.-

Notre analyse des protéines thyroïdiennes humaines de faible constante de sédimentation (fractions légères 3-8 S) révèle que ces fractions sont hétérogènes : elles comportent 3 protéines que nous avons séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide et par focalisation isoélectrique, et dont nous avons pu estimer les poids moléculaires (CERIANI et coll. 1971).

La fraction dont la migration est la plus rapide (F_1) a plusieurs caractères communs avec la sérum albumine humaine : même mobilité électrophorétique en gel de polyacrylamide, poids moléculaire semblable (70.000 environ), point isoélectrique similaire (environ 4,8) ; sa parenté antigénique avec la sérum albumine humaine a été prouvée par un sérum de lapin anti-sérumalbumine humaine. Cette albumine (F_1) est iodée, elle incorpore l'iode radioactif in vivo et in vitro, mais elle n'incorpore pas les acides aminés marqués au ^{14}C introduits

dans le milieu.de culture.

La présence d'une albumine iodée parmi les protéines solubles du tissu thyroïdien a déjà été observée par plusieurs auteurs dans diverses espèces animales : SHULMAN et coll. (1957) chez le porc, ROBBINS et coll. (1959) dans une tumeur expérimentale de thyroïde de rat, FOLLIS (1962) chez le hamster, TORRESANI et coll. (1968) chez le rat normal, FALCONER et coll. (1970) dans un goitre congénital de mouton. Une iodoalbumine a également été observée chez l'Homme dans des extraits thyroïdiens de goitres congénitaux, notamment par DE GROOT et STANBURY (1959), DE GROOT et CARVALHO (1960) LISSITZKY et coll. (1964, 1967, 1968), ainsi que dans des extraits de glandes thyroïdes humaines normales (JONCKHEER 1963).

Quelle est l'origine de cette iodoalbumine et quel peut être son rôle physiologique ?

En ce qui concerne son origine, deux possibilités sont à envisager : soit une origine sérique, soit une origine thyroïdienne. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que cette iodoalbumine serait synthétisée par les cellules thyroïdiennes elles-mêmes (LISSITZKY et coll. 1967, OTTEN et coll. 1971). Cependant notre étude montre que la fraction albumine (F_1) n'est pas synthétisée par le tissu thyroïdien en culture, puisqu'elle n'incorpore pas les acides aminés marqués au ^{14}C. De même, LISSITSKY et coll. (1968) ont montré, au cours d'une incubation in vitro d'un fragment de goitre, que la sérumalbumine n'était pas synthétisée par le tissu thyroïdien.

Nous pensons que l'origine de l'iodoalbumine doit être sérique. En culture, la présence de l'albumine marquée à l'iode 125 ajouté au milieu peut s'expliquer par l'iodation d'albumine présente dans la thyroïde avant la mise en culture, ou provenant du sérum de cheval ajouté au milieu de culture. Chez l'animal, on a montré également l'origine sérique de cette albumine : après injection intra-veineuse d'albumine hétérologue à des animaux ayant reçu de l'iode radioactif, VAN MIDDLEWORTH et

et TRIANTAPHYLLIDIS (1967) ont retrouvé dans le sang une albumine hétérologue contenant de l'iode radioactif.

En ce qui concerne le rôle physiologique éventuel de cette albumine, il semble que, dans certains cas pathologiques, elle remplace en partie la thyroglobuline pour la synthèse des hormones thyroïdiennes. En effet, dans le cas de goitre que nous avons étudié et où l'iodoalbumine était présente alors que la Tg était absente, la synthèse hormonale n'était pas nulle, puisque le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ était inférieur à 1 et que les hormones T_4 et T_3 étaient présentes en proportion non négligeable (5 %).

Un fait semblable a été rapporté par LISSITZKY et coll. (1967 et 1968), dans deux cas de goitres congénitaux humains. Dans les tissus thyroïdiens normaux marqués au radioiode en culture, nous avons observé également que l'albumine iodée renferme des iodotyrosines marquées (MIT en majorité), ainsi que des iodothyronines T_4 et T_3 marquées. TORRESANI et coll. (1968) ont également trouvé des hormones thyroïdiennes dans l'iodoalbumine provenant de thyroïdes de rat. On peut penser que la biosynthèse de T_4 et T_3 s'effectuerait moins facilement sur l'iodoalbumine que sur la thyroglobuline, ce qui pourrait expliquer en partie les anomalies de la synthèse hormonale dans certains cas pathologiques.

Les deux autres fractions (F_2 et F_3), migrant plus lentement que l'albumine à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, ne fixent pas l'iode, mais incorporent les acides aminés marqués au ^{14}C ; elles sont donc synthétisées par le tissu thyroïdien en culture. Leur point isoélectrique est proche de celui de la thyroglobuline (4,5 environ) (CERIANI et coll. 1971 b). Leurs poids moléculaires (85.000 et 95.000) sont voisins de ceux des chaînes peptidiques constitutives de la thyroglobuline, déterminés par divers auteurs. En effet, chez l'Homme, PIERCE et coll. (1965) ont montré que le traitement de la thyroglobuline par le β-mercaptoéthanol permet de préparer des chaînes de poids moléculaires 110.000 ou 125.000 ; chez le mouton, LISSITZKY et coll. (1968) ont trouvé des poids moléculaires de 80.000.

Il semble donc que les fractions F_2 et F_3, qui sont synthétisées en culture, pourraient être, du moins en partie, des précurseurs de la thyroglobuline. Nos résultats se rapprochent de ceux de ROQUES et coll. (1969) qui ont montré que, chez le rat, la fraction 3-8 S renferme des protéines de faible poids moléculaire (90.000 - 100.000), qui pourraient être des précurseurs métaboliques de la thyroglobuline. Les résultats de VECCHIO et coll. (1969) sont en accord avec cette hypothèse, puisqu'ils montrent que la fraction 6 S de thyroïde de rat est capable de s'associer in vitro à la sous-unité 12 S pour former des molécules de 19 S.

Nos résultats montrent en outre que les fractions F_2 et F_3, synthétisées par le tissu thyroïdien en culture, n'incorporent pas l'iode radioactif. Il a été montré (SEED et GOLDBERG, 1965, LISSITZKY 1965) que l'iodation de la thyroglobuline n'intervient qu'après sa synthèse. Mais le substrat de l'iodation n'est pas encore parfaitement déterminé. Il semble que l'iodation doit avoir lieu sur la thyroglobuline dimère, et non sur le monomère 12 S ou sur les chaînes peptidiques (NUNEZ et coll. 1965, LISSITZKY et coll. 1966). Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse, et montrent que les "précurseurs" de faibles poids moléculaires ne sont pas iodés.

CONCLUSION.-

Au cours de notre étude de la synthèse hormonale et des iodoprotéines thyroïdiennes chez l'Homme, dans des tissus thyroïdiens normaux et pathologiques, nous avons abordé quelques-uns des points qui sont encore obscurs dans les connaissances actuelles du métabolisme thyroïdien. De nos résultats, à notre avis, on peut dégager les faits suivants :

1° - La teneur en hormones thyroïdiennes T_4 et T_3 marquées à la 24ème heure (^{131}I) est faible dans les tissus thyroïdiens pathologiques. Cependant, dans la plupart des tissus pathologiques, de même que dans les tissus normaux, la teneur en hormones marquées est plus élevée quelques jours après le marquage qu'à la 24ème heure. Nos résultats concordent avec ceux d'autres auteurs, et montrent que la teneur en hormones thyroïdiennes marquées à l'iode radioactif augmente avec le temps.

2° - Les troubles de la synthèse hormonale observés dans diverses maladies thyroïdiennes ne semblent pas liés à des anomalies dans les caractères de la thyroglobuline. En effet, dans la plupart des tissus thyroïdiens pathologiques que nous avons étudiés, les caractères de solubilité et les profils de sédimentation des iodoprotéines sont normaux. Nous n'avons pas observé la présence de thyroglobuline anormale (ayant un coefficient de sédimentation très inférieur à 19 S). Ceci est en accord avec l'opinion admise actuellement par la plupart des auteurs.

3° - Cependant, dans deux cas de goitres exceptionnels, les courbes de solubilité des iodoprotéines étaient tout à fait anormales, et dans l'un des ces deux cas, qui a été étudié par ultracentrifugation, le profil de sédimentation était également anormal : ce tissu goitreux ne comportait que la fraction iodoprotéique légère 3-8 S. Ce fait semble extrêmement rare ; cependant, 7 cas analogues ont été décrits précédemment : ROCHE et Coll. (1959), MICHEL et Coll. (1964), LISSITZKY et Coll. (1967 et 1968).

Dans ces goîtres, malgré l'absence de thyroglobuline,

les iodothyronines sont présentes dans le tissu thyroïdien. La présence de thyroglobuline ne semble donc pas indispensable pour la synthèse des hormones thyroïdiennes.

4° - Le taux d'iodation de la thyroglobuline, ainsi que la teneur en iode stable (^{127}I) du tissu thyroïdien, sont plus faibles dans les tissus pathologiques que dans les tissus normaux. La teneur en iode semble un facteur important de la synthèse hormonale ; en effet, nous avons observé une relation linéaire entre la teneur en hormones T_4 et T_3 marquées à l'iode radioactif et la teneur en iode du tissu thyroïdien, ou mieux de la thyroglobuline.

Dans les tissus pathologiques, la teneur en thyroglobuline est inférieure à la normale, mais le taux d'iodation de cette protéine est diminué en proportion beaucoup plus importante : il semble donc que, dans la plupart des glandes pathologiques, le défaut d'iodation soit plus net que le défaut de synthèse de la thyroglobuline.

5° - Le pourcentage d'iodoprotéines marquées à l'iode radioactif, plus solubles que la thyroglobuline dans le sulfate d'ammonium et sédimentant plus lentement, n'est supérieur à la normale que dans quelques cas parmi les nombreux cas pathologiques très divers que nous avons étudiés. Bien que plusieurs cas aient été rapportés, isolément, par divers auteurs, il semble donc d'après notre étude systématique que ce fait soit assez rare.

Cependant, la teneur en iodoprotéines légères stables, que nous avons déterminée dans quelques tissus pathologiques, semble élevée dans les cas d'hyperthyroïdies traitées par antithyroïdiens et de cancers thyroïdiens.

6° - La TSH ajoutée au milieu de culture a dans certains cas un effet stimulant sur l'incorporation de l'iode radioactif dans les iodoprotéines thyroïdiennes solubles. Mais

elle ne semble pas modifier la répartition du radioiode dans les différentes fractions séparées par ultracentrifugation.

7° - Le tissu thyroïdien humain maintenu en culture incorpore les acides marqués au ^{14}C dans les fractions 3-8 S, 17 - 19 S et 27 S. Nous n'avons pas mis en évidence de fraction 12 S marquée, contrairement à ce qu'on observe chez le rat ou le mouton.

Par la méthode de culture organotypique, qui permet de maintenir le tissu thyroïdien pendant plusieurs jours, nous avons pu montrer que les fractions légères 3-8 S ne sont pas des produits de dégradation de la thyroglobuline.

8° - Nous avons séparé ces protéines légères 3-8 S en 3 fractions différentes. La fraction principale est une protéine analogue à la sérum albumine humaine. Nos résultats confirment donc la présence d'une albumine iodée dans le tissu thyroïdien normal, ainsi que cela a été signalé par différents auteurs. En outre, nos résultats montrent que le poids moléculaire et le point isoélectrique de cette protéine sont analogues à ceux de la sérum albumine humaine.

L'origine de cette albumine iodée est encore controversée. Nos résultats montrent que cette albumine n'incorpore pas les acides marqués au ^{14}C, elle n'est donc pas synthétisée par le tissu thyroïdien. Nous pensons que son origine doit être sérique.

9° - Notre étude de la fraction légère 3-8 S par électrophorèse en gel de polyacrylamide et par focalisation isoélectrique a mis en évidence, en plus de l'albumine, 2 autres fractions. Ces 2 fractions incorporent les acides aminés marqués au ^{14}C, mais ne fixent pas l'iode radioactif ; leur point isoélectrique est analogue à celui de la thyroglobuline (4,5), et leurs poids moléculaires (85.000 et 95.000) sont voisins de ceux des chaines peptidiques constitutives

de la thyroglobuline. Ces 2 fractions pourraient donc être, du moins en partie, des précurseurs métaboliques de la thyroglobuline.

On sait que l'iodation de la thyroglobuline n'intervient qu'après sa synthèse, mais le substrat de l'iodation n'est pas encore connu avec certitude. Il semble cependant que l'iodation doit avoir lieu sur la thyroglobuline dimère, et non sur le monomère 12 S ou sur les chaines peptidiques. Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse et montrent que les "précurseurs" de faible poids moléculaire ne sont pas iodés.

B I B L I O G R A P H I E

ALOJ, S. - SALVATORE, G. - ROCHE, J. (1967)
Isolation and properties of a native subunit of lamprey thyroglobulin.
J. Biol. Chem., 242, 3810.

BECKERS, C. - DE VISSCHER, M. (1960)
Etudes des protéines thyroïdiennes dans un cancer de la glande thyroïde.
Ann. Endocr., Paris, 21, 765.

BECKERS, C. - DE VISSCHER, M. (1961)
Thyroid proteins in endemic goiter.
Metabolism, 10, 695.

BECKERS, C. (1962)
L'hormonogénèse dans les goîtres endémiques et sporadiques.
Ed. Arscia, Bruxelles, et Librairie Maloine, Paris.

CASSANO, C. - MONACO, F. - FONTANA, S. - ANDREOLI, M. (1970)
Caractérisation physico-chimique et immunologique d'une thyroglobuline anormale dans des goitres congénitaux humains.
VI. Intern. Thyr. Conf., Vienne 1970, Résumés p. 64.

CAVALIERI, R.R. - SEARLE, G.L. (1967)
Biosynthesis of thyroglobulin and subunits in the rat thyroid gland in vivo.
Biochem. J., 102, 25.

CERIANI, R. - THOMAS-MORVAN, C. - NATAF, B. (1971 a)
Analyse des protéines solubles thyroïdiennes humaines de faible poids moléculaire (fraction 3-8 S) : études in vivo et en culture organotypique.
C.R. Acad. Sc. Paris, 272, Séris D., 2089.

CERIANI, R. - THOMAS-MORVAN, C. - NATAF, B. (1971 b)
Difference in isoelectric point of 27 S and 19 S thyroidal iodoproteins determined by isoelectric focusing.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 136, 1351.

CHEN, J.M. (1954)
The cultivation in fluid medium of organized liver, pancreas and other tissues of fetal rats.
Exp. Cell. Res. 7, 518.

DE CROMBRUGGHE, B. (1968)
Propriétés moléculaires de la thyroglobuline normale et pathologique.
Librairie Universitaire, Louvain.

DAVIS, B.J. (1964)
Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404.

DE GROOT, L.J. - STANBURY, J.B. (1959)
The syndrome of congenital goiter with butanol insoluble serum iodine.
Amer. J. Med., 27, 586.

DE GROOT, L.J. - CARVALHO, E. (1960)
Studies on proteins of normal and diseased thyroid glands.
J. Clin. Endocr., 20, 21.

DERRIEN, Y. - MICHEL, R. - ROCHE, J. (1948)
Recherches sur la préparation et les propriétés de la thyroglobuline pure.
Biochim. Biophys. Acta, 2, 454.

EASTY, G.C. - SLATER, B.R. - STANLEY, P.G. (1958)
The purity of thyroglobulin isolated from normal and carcinomatous thyroid tissue of one patient by fractional salting-out with ammonium sulphate.
Biochem. J., 68, 210.

EKHOLM, R. - STRANDBERG, U. (1967)
Studies on the protein synthesis in the guinea-pig thyroid. II in vivo labeling of thyroglobulin with ^{3}H-leucine.
J. Ultrastruct. Res., 17, 184.

ERMANS, A.M. - BASTENIE P.A. - GALPERIN, H. - BECKERS, C. - VAN DEN SCHRIECH, H.G.- DE VISSCHER, M. (1961)
Endemic goiter in the Uele region. Synthesis and secretion of thyroid hormones.
J. Clin. Endocr., 21, 996.

ERMANS, A.M. - DECOSTRE, P. - KINTHAERT, J.-COLLARD, J. (1965)
Kinetics of the synthesis of thyroid hormones in normal man and in simple goiter.
Current Topics in Thyroid Research, V. Intern. Thyr. Conf., Rome 1965, p.83

ETLING, N. - BOUHNIK, J. (1969)
Etude des iodoaminoacides marqués de thyroïdes pathologiques et comparaison avec ceux de thyroïdes humaines normales.
Ann. Endocr., Paris, 30, 633.

FALCONER, I.R. - ROITT, I.P. - SEAMARK, R.F. - TORRIGIANI, G. (1970)
Studies of the congenitally goitrous sheep. Iodoproteins of the goiter.
Biochem. J., 117, 417.

FOLLIS, R.H. (1962)
Iodinated protein patterns in thyroids from normal and iodine deficient hamsters.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 57.

HEIDELBERGER, M. - PALMER, W.W. (1933)
The preparation and properties of thyroglobulin
J. Biol. Chem., 101, 433.

HOFER, R. - PFEIFFER, G. (1963)
A new method for studying iodine metabolism in the thyroid gland using a double tracer technique.
Minerva Nucleare, 7, 165.

JONCKHEER, M.H. (1963)
Présence d'une albumine comme constituant normal des protéines thyroïdiennes
Ann. Endocr., Paris, 24, 756.

LACHIVER, F., FONTAINE, Y.A. - MARTIN, A. (1965)
The iodination in vivo of thyroid proteins in various vertebrates.
Current Topics in Thyroid Research, V. Intern. Thyr. Conf., Rome 1965, p. 18

LAMAS, L. - DORRIS, M. - TAUROG, A. (1971)
Chemical versus thyroid peroxidase catalyzed iodination of protein : efficiency of T_4 formation.
47th meeting American Thyr. Assoc., Birmingham 1971, Résumés p. 66.

LISSITZKY, S. - ROQUES, M. - TORRESANI, J. - SIMON, C. - BOUCHILLOUX S. (196
Iodination and biosynthesis of rat thyroglobulin.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 249.

LISSITZKY, S. - ROQUES, M. - TORRESANI, J. - SIMON, C. (1965)
Biosynthèse, iodation et hétérogénéité de la thyroglobuline.
Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris), 47, 1999.

LISSITZKY, S. - SIMON, C. - ROQUES, M. - TORRESANI, J. (1966)
Thyroglobulin maturation in rat and nomenclature of thyroglobulin like proteins.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 23, 429.

LISSITZKY, S. - CODACCIONI, J.L. - BISMUTH, J. - DEPIEDS, R. (1967)
Congenital goiter with hypothyroidism and iodo-serum albumin replacing thyroglobulin.
J. Clin. Endocr., 27, 185.

LISSITZKY, S. - BISMUTH, J. - CODACCIONI, J.L. - CARTOUZOU, G. (1968 a)
Congenital goiter with iodoalbumin replacing thyroglobulin and defect of deiodination of iodotyrosines. Serum origin of the thyroid iodoalbumin.
J. Clin. Endocr., 28, 1797.

LISSITZKY, S. - ROLLAND, M. - REYNAUD, J. - SAVARY, J. - LASRY, S. (1968 b)
Structure sous-unitaire de la thyroglobuline de mouton.
European J. Biochem. 4, 464.

LOBO, G.L. - FRIDMAN, J. - REBELLO, M.A. - HARGREAVES, F. - FIGUEIREDO, J.C. (1966)
Studies on the thyroidal proteins.
Metabolism, 15, 330.

MARTIN, R.J. - AMES, B.N. (1961)
A method for determining the sedimentation behavior of enzymes : application to proteins mixtures.
J. Biol. Chem. 236, 1372.

MATES, G.P. - SHULMAN, S. (1969)
Studies on thyroid proteins. VI. Immunochemical studies on the 4 S and 7 S tissue specific thyroid proteins.
Immunochem., 6, 35.

MICHEL, R. - RALL, J.E. - ROCHE, J. - TUBIANA, M. (1964)
Thyroidal iodoproteins in patients with goitrous hypothyroidism.
J. Clin. Endocr., 24, 352.

NATAF, B. - CHAIKOFF, I.L. (1965)
The effect of insulin on iodine metabolism of fetal thyroid glands in organ culture.
Biochim. Biophys. Acta, 111, 422.

NATAF, B. - MALAISE, E. - TUBIANA, M. - GERARD-MARCHANT, R. (1966)
Culture organotypique de thyroïde humaine.
C.R. Acad. Sci., Paris, 243, Série D, 166.

NATAF, B. - MALAISE, E. - GERARD-MARCHANT, R. - THOMAS, C. - TUBIANA, M. (1969)
The use of the organ culture technique in the study of 21 cases of human thyroid cancer.
UICC Monograph Series, Vol. 12 : Thyroid Cancer, p. 224. Chr. Hedinger edit., Springer-Verlag.

NATAF, B. - THOMAS-MORVAN, C. - TUBIANA, M. (1970)
Synthèse de thyroglobuline en culture organotypique de thyroïde humaine.
C.R. Acad. Sc. Paris, 270, série D, 2706.

NUNEZ, J. - MAUCHAMP, J. - MACCHIA, V. - ROCHE, J. - (1965)
Biosynthèse in vitro d'hormones doublement marquées dans des coupes de corps thyroïde. II. Biosynthèse d'une préthyroglobuline non iodée.
Biochim. Biophys. Acta, 107, 247.

NUNEZ, J. - PAVLOVIC-HOURNAC, M. - RAPPAPORT, L. - ROCHE, J. (1967)
Synthèse in vivo et in vitro de la thyroglobuline et de ses précurseurs chez le rat.
Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris), 49, 1295.

OTTEN, J. - JONCKHEER, M. - DUMONT, J.E. (1971)
Thyroid albumin. II. In vitro synthesis of a thyroid albumin by normal human thyroid tissue.
J. Clin. Endocr. 32, 18.

PAVLOVIC-HOURNAC, M. - RAPPAPORT, L. - NUNEZ, J. - ROCHE, J. (1966)
Sur la biosynthèse d'une protéine spécifique en culture organotypique ; synthèse et iodation de la thyroglobuline par le corps thyroïde.
C.R. Soc. Biol., 160, 1841.

PEYRIN, J.O. - BERGER, M. - VERNAY, M.J. - BRIERE, J. (1967)
Etude des protéines extraites de l'adénome thyroïdien toxique.
Ann. Endocr., Paris, 28, 753.

PIERCE, G. - RAWITCH, A.B. - BROWN, D.M. - STANLEY, P.G. (1965)
Human thyroglobulin : studies on the native and S-carboxymethylated protein.
Biochim. Biophys. Acta, 111, 247.

PITT-RIVERS, R. - HUBBLE, D. - HOATHER, W.H. (1957)
A chromatographic study of thyroidal iodine metabolism in non toxic nodular goiter.
J. Clin. Endocr., 17, 1313.

RALL, J.E. - ROBBINS, J. - EDELHOCH, H. (1960)
Iodoproteins in the thyroid.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 86, 373.

ROBBINS, J. - WOLFF, J. - RALL, J.E. (1959)
Iodoproteins in normal and abnormal human thyroid tissue and in normal sheep thyroid.
Endocrinology, 64, 37.

ROBBINS, J. (1970)
Abnormal thyroglobulin in a rat thyroid tumor.
VI. Intern. Thyr. Conf., Vienne 1970, Résumés p. 63.

ROCHE, J. - MICHEL, R. - MICHEL, O. - DELTOUR, G.-LISSITZKY, S. (1951)
Thyroglobuline marquée ou artificiellement iodée sans dénaturation.
Biochim. Biophys. Acta, 6, 572.

ROCHE, J. - MICHEL, R. - TUBIANA, M. (1959)
Caractères de la thyroglobuline anormale extraite de certains goitres congénitaux avec troubles de l'hormonogénèse.
Rev. Franç. Etudes Clin. Biol., 10, 1051.

ROCMANS, P. - DELANGE, F. - CALAY, R. - DUMONT, J.E. - ERMANS, AM. (1965)
Utilisation simultanée de deux isotopes de l'iode (^{125}I et ^{131}I) dans l'étude physiologique, biochimique et clinique de la fonction thyroïdienne.
Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung, Urban et Schwarzenberg edit., Intern. Symposium, Bad Gastein 1964, p. 59.

ROQUES, M. - TORRESANI, J. - LISSITZKY, S. (1969)
Biosynthèse de la thyroglobuline. Précurseurs métaboliques de faible poids moléculaire.
Biochim. Biophys. Acta, 194, 406.

SALABE, G.B. - TONELLI, S. - SALABE, H. - BASCHIERI, L. (1965)
Soluble thyroid iodoproteins and iodine kinetics in thyroglobulin of nodular goiter.
Current Topics in Thyroid Research, V. Intern. Thyr. Conf., Rome 1965, p. 900.

SALVATORE, G. - SALVATORE, M. - CAHNMANN, H.J. - ROBBINS, J. (1964)
Separation of thyroidal iodoproteins and purification of thyroglobulin by gel filtration and density gradient centrifugation.
J. Biol. Chem. 239, 3267.

SALVATORE, G. - VECCHIO, G. - SALVATORE, M. - CAHNMANN, H. - ROBBINS, J. (1965 a)
27 S thyroid iodoprotein. Isolation and properties.
J. Biol. Chem., 240, 2935.

SALVATORE, G. - SENA, L. - VISCIDI, E. - SALVATORE, M. (1965 b)
The thyroid iodoproteins 12 S, 19 S and 27 S in various animal species and their physiological significance.
Current Topics in Thyroid Research, V. Intern. Thyr. Conf., Rome 1965, p. 193.

SEED, R.W. - GOLDBERG, I.H. (1963)
Biosynthesis of thyroglobulin : relationship to RNA-template and precursor protein.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 50, 275.

SEED, R.W. - GOLDBERG, I.H. (1965)
Biosynthesis of thyroglobulin. II. Rôle of subunits, iodination, and ribonucleic acid synthesis.
J. Biol. Chem., 240, 764.

SHAPIRO, A.L. - VINUELA, E. - MAIZEL, J.V. (1967)
Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Com., 28, 815.

SHULMAN, S. - ROSE, N.R. - WITEBSKY, E. (1955)
Studies on organ specificity. III. Ultracentrifugal and electrophoretic examinations of thyroid extracts.
J. Immunol., 75, 291.

SHULMAN, S. - ROSE, N.R. - WITEBSKY, E. (1957)
Thyralbumin - a new antigen from thyroid tissue.
Fed. Proc., 16, 433.

SIMON, C. - ROQUES, M. - TORRESANI, J. - LISSITZKY, S. (1966)
Effect of propylthiouracil on the iodination and maturation of rat thyroglobulin.
Acta Endocrinol., 53, 271.

STANLEY, P.G. (1956)
The iodine containing proteins of normal and abnormal thyroid tissue.
Biochem. J., 63, 581.

TAUROG, A. (1963)
Spntaneous deiodination of ^{131}I labelled thyroid extracts on filter paper.
Endocrinology, 73, 57.

THIER, S.O. - BLACK, P. - WILLIAMS, H.E. - ROBBINS, J. (1965)
Chronic lymphocytic thyroiditis : report of a kindred with viral, immunological and chemical studies.
J. Clin. Endocr., 25, 65.

THOMAS, C. - NATAF, B. - TUBIANA, M. (1966)
Etude de l'hormonogénèse thyroïdienne chez l'Homme par la méthode de double marquage.
Rev. Franç. Etudes Clin. Biol., 11, 1030.

THOMAS, C. - NATAF, B. - TUBIANA, M. (1967)
Etude par la méthode du double marquage de l'action des antithyroïdiens sur l'hormonogénèse chez l'Homme et chez le chien.
Rev. Franç. Etudes Clin. Biol., 12, 467.

TONG, W. - RAGHUPATHY, E. - CHAIKOFF, I.L. (1963)
Recovery of thyroxine from thyroid protein hydrolysed with pancreatic and bacterial proteases.
Endocrinology, 72, 931.

TORRESANI, J. - ROQUES, M. - PEYROT, A. - LISSITZKY, S. (1968)
Mise en évidence, purification et propriétés d'une iodoalbumine, constituant physiologique de la glande thyroïde de rat.
Acta Endocrinol., 57, 153.

TRIANTAPHYLLIDIS, E. - TUBIANA, M. (1956)
Etude du métabolisme de l'iode dans le tissu cancéreux.
Bull. Soc. Fr. Cancer, 43, 2666.

TUBIANA, M. - VIGNALOU, J. - NATAF, B. - THOMAS, C. - PARMENTIER, C. - BARRE, C. - MONNIER, J.P. (1968).
Goître avec troubles de formation des iodothyronines et présence d'iodoprotéines anormales.
Ann. Endocr., Paris, 29, 313.

UI, N. - TARUTANI, O. - KONDO, J. - TAMURA, H. (1961)
Chromatographic fractionation of hog thyroglobulin.
Nature, 191, 1199.

VALENTA, L. - ROQUES, M. - TORRESANI, J. - ROLLAND, M.-LISSITZKY, S. (1968)
Human thyroglobulin. Physicochemical properties in relation to iodine content.
Biochim. Biophys. Acta, 168, 507.

VAN JAARSVELD, P.P. - SENA, L. - VAN DER WALT, B. - VAN ZYL, A. (1970)
Iodoprotéines anormales dans un goître congénital bovin.
VI. Intern. Thyr. Conf., Vienne 1970, Résumés p. 65.

VAN MIDDLESWORTH, L. - TRIANTAPHYLLIDIS, E. (1968)
Abnormal changes in neoplastic hamster thyroids.
Thyroid Neoplasia, p. 415, S.Young et D.R. Inman edit. (Academic Press).

VECCHIO, G. - SALVATORE, M. - SALVATORE, G. (1966)
Biosynthesis of thyroglobulin in vivo : formation and polymerization of subunits in the rat and guinea pig.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 25, 402.

VECCHIO, G. - CARLOMAGNO, M.S. - CIAAR, G.M. (1969)
Biosynthesis of thyroglobulin : partial characterization of a labelled 6 S precursor.
FEBS Letters, 4, 323.

WRIGLEY, C.W. (1968)
Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrofocusing.
J. Chromat., 36, 362.

ZWAAN, J. (1967)
Estimation of molecular weights of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis.
Analyt. Biochem., 21, 155.